

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI**

**Dottorato di Ricerca in  
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento  
dell'Uomo"**

**Coordinatore: Prof. Claudio Pignata**

**Tesi di Dottorato**

***"GRAVIDANZE AD ALTO RISCHIO: NUOVE STRATEGIE PER  
MIGLIORARE L'OUTCOME MATERNO-FETALE"***

**Tutore  
Prof. Pasquale Martinelli**

**Candidato  
Dott.ssa Stefania Simioli**

**Anno Accademico 2013-2014**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE: LA GRAVIDANZA “A RISCHIO”</b>	<b>pag. 4</b>
--	---------------

<b>CAPITOLO 1: IL SISTEMA ADRENERGICO E GRK2 NEI DISORDINI IPERTENSIVI IN GRAVIDANZA</b>	<b>pag. 7</b>
--	---------------

*a) Espressione linfocitaria di GRK2 in pazienti con gravidanze complicate da disturbi ipertensivi e correlazione con parametri clinic materni e fetali.*

OBIETTIVI	pag. 14
MATERIALI E METODI	pag. 15
RISULTATI	pag. 19
DISCUSSIONE	pag. 25
CONCLUSIONI	pag. 28
BIBLIOGRAFIA	pag. 29

*b) Espressione linfocitaria di GRK2 in pazienti co gravidanza complicata da disordini ipertensivi e correlazione con l’outcome neurologico fetale.*

OBIETTIVI	pag. 33
MATERIALI E METODI	pag. 34
RISULTATI	pag. 38
DISCUSSIONE	pag. 42
CONCLUSIONI	pag. 44
BIBLIOGRAFIA	pag. 45

<b>CAPITOLO 2: DIAGNOSI PRENATALE DELLE ANOMALIE FETALI</b>	<b>pag. 48</b>
---	----------------

*a) Screening prenatale e counseling per malattie genetiche.*

OBIETTIVI	pag. 60
MATERIALI E METODI	pag. 61
RISULTATI	pag. 62
DISCUSSIONE	pag. 66
CONCLUSIONI	pag. 71



## BIBLIOGRAFIA

pag. 72

### *Pubblicazioni:*

1. *Prenatal screening and counseling for genetic disorders.* pag. 76
2. *Talassemia, Preeclampsia e villocentesi: esiste una correlazione?* pag. 80

### ***b) Diagnosi prenatale della Sindrome della Rosolia Congenita.*** pag. 83

OBIETTIVI pag. 88

MATERIALI E METODI pag. 89

RISULTATI pag. 92

DISCUSSIONE pag. 98

CONCLUSIONI pag. 102

BIBLIOGRAFIA pag. 103

### *Pubblicazioni:*

1. *Prenatal diagnosis of congenital rubella infection and ultrasonography: a preliminary study.* pag. 108
2. *Diagnosi ecografica e management di cisti ovarica fetale.* pag. 113
3. *Idrope fetale: esperienza annuale del nostro centro.* pag. 116

## **CAPITOLO 3: MANAGEMENT DELLE GRAVIDANZE “AD ALTO RISCHIO”**

pag. 117

### *Pubblicazioni:*

1. *Anesthetic management of a parturient with spinal muscular atrophy type II.* pag. 119
2. *A quadruplet pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus: obstetrical management and neonatal outcomes.* pag. 124
3. *Obstetrical management in patients with portal cavernoma.* pag. 126
4. *Virilizing ovarian Krukenberg tumor in a pregnant woman.* pag. 128
5. *L'entropia approssimata come nuovo parametro per il timing del parto nelle gravidanze complicate da diabete.* pag. 129

## LA GRAVIDANZA “A RISCHIO”

In generale, si definisce *rischio* il danno incerto cui un dato soggetto si trova esposto in seguito di possibili eventi o concatenazione favorevole degli stessi. L'incertezza che si associa alla condizione di danno potenziale ha una duplice origine: da un lato eventi sfavorevoli e temuti si possono verificare con probabilità più o meno grande, ma mai nulla, dall'altro, l'entità del danno può variare in relazione a circostanze esterne che, a causa della loro aleatorietà, non possono essere previste in modo certo ed univoco.

In medicina il *rischio* è inteso come la probabilità – possibilità che si produca un'alterazione dello stato di salute in seguito all'esposizione ad una determinata condizione, sostanza chimica o entità fisica.

L'approfondimento del concetto di rischio in medicina risale sorprendentemente a circa 1000 anni fa: gli storici riportano, infatti, che Avicenna, nel libro “Il canone della medicina” (1020s), stilò la più antica analisi dei cosiddetti fattori di rischio.

Tuttavia, il primo utilizzo del termine *fattore di rischio* in senso moderno, correlato cioè all'analisi statistica di osservazioni epidemiologiche, si deve a Thomas Royle Dawber, cardiologo statunitense che per primo effettuò uno studio sui fattori di rischio cardiovascolare e pubblicò i primi dati nel 1961.

Il concetto di “rischio” in medicina è tanto più importante quanto nello specifico settore dell'ostetricia, in cui il grado di “rischio” rappresenta un fattore discriminante per la definizione, la classificazione nonché il management diagnostico-terapeutico di una gravidanza. Quest'ultima, ancorché evento fisiologico e indispensabile al mantenimento della specie umana, comporta inevitabilmente un certo grado di rischio per la madre, il feto o per ambedue.

Una gravidanza è considerata “a rischio” nel caso in cui esistono condizioni patologiche reali o potenziali che possono compromettere la salute o la vita della madre, del feto o di entrambi. Queste condizioni patologiche sono responsabili quindi di un aumento della morbilità e della mortalità materna, fetale e neonatale rispetto

alla popolazione generale e sono, a tutt'oggi, di grande interesse clinico, epidemiologico e scientifico.

Il rischio gravidico può derivare da una patologia materna che ha primitivamente origine nell'organismo materno o da una patologia embrio-fetale, che ha primitivamente origine nel prodotto del concepimento.

Nell'ambito della patologia materna si distinguono:

- Malattie che preesistevano prima della gravidanza, o che si possono manifestare accidentalmente anche durante la gravidanza (malattie in gravidanza);
- Malattie che sono favorite dallo stato gravidico pur non essendo esclusive di quest'ultimo (malattie favorite dalla gravidanza);
- Malattie che compaiono esclusivamente in gravidanza (malattie indotte dalla gravidanza o gestosi).

La patologia embrio-fetale riconosce alla base due ordini di fattori: genetici ed ambientali. I primi s'identificano con il patrimonio ereditario dell'embrione (genotipico) e costituiscono il suo potenziale genetico; i fattori ambientali sono invece rappresentati dall'insieme delle influenze estrinseche al prodotto del concepimento, potendo quindi derivare dall'ambiente intrauterino, dall'organismo della madre o dall'ambiente esterno.

Nel 2-3% dei nati è presente un'anomalia congenita, le cui cause possono essere di origine genetica (10-25%), ambientale (10%) o sconosciute (65-75%).

Le malattie genetiche si dividono in:

- anomalie cromosomiche (strutturali e numeriche);
- malattie monogeniche (autosomiche o legate al sesso, recessive o dominanti);
- malattie multifattoriali.

Le anomalie cromosomiche interessano lo 0,5% dei nati vivi, ma l'incidenza associata all'aborto spontaneo è molto più alta, stimata intorno al 70%.

Le malattie monogeniche, determinate dall'azione di singoli geni mutati, sono piuttosto rare prese singolarmente, ma la loro importanza è rilevante sia per l'alta

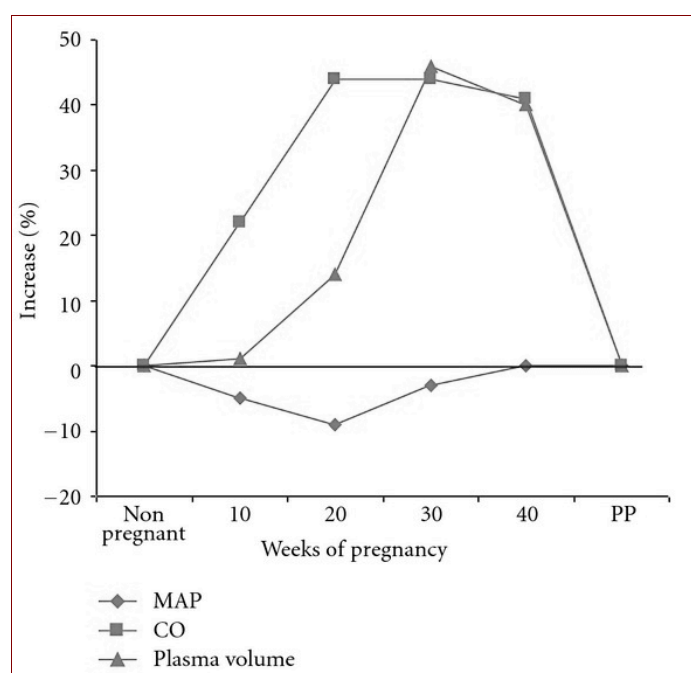
frequenza globale (1%) sia per la gravità della maggior parte di esse, sia per gli elevati rischi di ricorrenza nelle famiglie in cui si presentano.

Le malattie multifattoriali rappresentano infine il risultato dell'interazione di più geni con fattori ambientali. Esse rappresentano le più comuni malformazioni congenite (spina bifida, labiopalatoschisi, etc.) e presentano un rischio di ricorrenza, nell'ambito della stessa coppia, dell'1-5%.

Un approccio completo alla gravidanza non può pertanto prescindere dalla valutazione del rischio materno-fetale legato a quella stessa gravidanza. Il counseling prenatale o, ancor meglio, preconcezionale ha il compito di evidenziare tutti gli aspetti che possono influenzare negativamente la gravidanza, mediante un'attenta anamnesi personale della coppia, la storia familiare, la storia riproduttiva e le abitudini di vita della gestante (tipo di occupazione, aspetti nutrizionali, fumo, etc.).

## ***IL SISTEMA ADRENERGICO E GRK2 NEI DISORDINI IPERTENSIVI IN GRAVIDANZA***

La preeclampsia è caratterizzata da un aumento delle resistenze vascolari a livello sistemico, in contrapposizione con quanto accade in una gravidanza fisiologica, dove invece si assiste ad una progressiva riduzione delle resistenze periferiche con aumento della volemia.



**Figura 1.** Rappresentazione dell'andamento della pressione arteriosa media (MAP), della gittata cardiaca (CO) e del volume plasmatico (Plasma Volume) in una gravidanza fisiologica.

Il fatto che le principali differenze che si riscontrano nella preeclampsia rispetto alla gravidanza fisiologica riguardino parametri cardiaci, suggerisce che in questa patologia vi sia un aumento dell'attività simpatica, e questo ha fatto spostare l'attenzione di numerosi autori sul ruolo giocato dal sistema nervoso simpatico (SNS). Fondamentalmente, tale sistema si avvale di recettori sette-tratti-transmembrana noti come recettori *adrenergici* (Adrenergic-Receptors AR), espressi a livello delle membrane cellulari.

Tali recettori sono suddivisibili in 2 grossi gruppi:  $\alpha$  e  $\beta$ .

Gli  $\alpha$ -recettori sono a loro volta suddivisi in due sottogruppi:

- $\alpha 1$  espressi a livello post-sinaptico e con azione vasocostrittrice
- $\alpha 2$  espressi a livello pre-sinaptico con effetto d'inibizione dell'ulteriore rilascio di catecolamine.

I  $\beta$ -recettori, invece, sono suddivisi in 3 sottogruppi:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ .

- $\beta 1$  espressi principalmente a livello cardiaco, dove la loro attivazione ha un effetto inotropo, cronotropo, dromotropo e batmotropo positivi;
- $\beta 2$  espressi principalmente a livello bronchiale (con azione di broncodilatazione), a livello vascolare (anche se in misura di gran lunga minore rispetto ai recettori  $\alpha 1$ , con azione di vasodilatazione);
- $\beta 3$  che mediano la lipolisi nel tessuto adiposo bianco e la termogenesi nel tessuto adiposo bruno.

Gli ARs appartengono alla famiglia dei G-Protein Coupled Receptors (GPCRs); di fatto sono associati alle **G-Proteins**, proteine citosoliche costituite da 3 subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) in grado di innescare una serie di reazioni a cascata intracellulari permettendo così la trasduzione del segnale.

Il ruolo del SNS, e le modifiche che esso subisce durante una gravidanza fisiologica o complicata da preeclampsia, sono stati analizzati in diversi modi. Innanzitutto, sono stati condotti numerosi studi con metodiche non invasive quali: la manovra di Valsalva, il test di stimolazione con il freddo ed altri; questi test hanno il vantaggio di essere facilmente ripetibili e di ridurre al minimo i rischi per la madre e per il feto. Tuttavia, tali test non si sono dimostrati sufficientemente sensibili per discriminare uno stato preeclamptico da uno non-preeclamptico. Altri studi, invece, hanno valutato la variazione dell'attività simpatica a livello dell'unità neuro-muscolare, dimostrando così che nella preeclampsia si ha un'iperattività del SNS, che tende a normalizzarsi al termine della gravidanza stessa.

Contemporaneamente all'aumentata attività vasocostrittrice simpatico-mediata, nella preeclampsia si osserva anche una risposta vasodilatante marcatamente ridotta. I responsabili di questa ridotta tendenza alla vasodilatazione sono i recettori  $\beta_2$  adrenergici: se in una gravidanza fisiologica si può spiegare la riduzione delle resistenze vascolari come conseguenza dell'aumento dell'attività  $\beta_2$ -adrenergica, allo stesso modo nella preeclampsia i livelli di  $\beta_2$ -recettori si dimostrano marcatamente ridotti. L'utilizzo combinato di  $\beta_2$  e  $\beta_3$  agonisti (ritodrina e BRL 37344, rispettivamente) riesce ad indurre vasodilatazione dell'arteria ombelicale, dimostrando che entrambi i sottotipi recettoriali sono espressi a tale livello; tuttavia, sembra che l'effetto dilatante  $\beta_3$  mediato sia quello predominante.

E' stato però dimostrato che la risposta vasodilatante e la produzione di cAMP è marcatamente ridotta in vasi placentari ottenuti da pazienti preeclamptiche rispetto ai controlli, anche dopo stimolazione con agonisti  $\beta_3$  selettivi; Hynes et al., nel 2008, hanno dimostrato che i livelli di mRNA codificante per i  $\beta$ AR, e i livelli di espressione proteica, sono sostanzialmente sovrapponibili in gravidanze fisiologiche e in gravidanze complicate da preeclampsia. Questo suggerisce che, alla base dell'alterata risposta simpatica, vi sia un'alterazione nella trasmissione intracellulare del segnale piuttosto che una alterazione nell'espressione dei recettori.

### *Regolazione della risposta adrenergica*

Tutti i GPCRs si caratterizzano per un meccanismo di perdita a breve e a lungo termine della sensibilità cellulare che si manifesta in risposta ad uno stimolo persistente: tale processo viene definito *desensibilizzazione*, o *desensitizzazione*. La desensibilizzazione a breve termine si attua attraverso la fosforilazione del recettore attivato da parte di alcune Serin-Treonina Chinasi, le G protein-coupled receptors Kinases (GRKs) che permettono il reclutamento della beta-arrestina al recettore fosforilato destinandolo, così, all'endocitosi e alla degradazione o al riciclo.

La desensibilizzazione a lungo termine, invece, può includere uno o più dei seguenti meccanismi: down-regulation del recettore o delle molecole a valle nel pathway di

trasduzione del segnale mediante degradazione proteolitica, ridotta sintesi della proteina recettoriale e/o dei suoi effettori, aumentata degradazione dei trascritti di mRNA.

Distinguiamo, inoltre, una:

- **Desensibilizzazione eterologa:** per cui non è necessario che l'agonista occupi il suo sito di legame col recettore. Un secondo messaggero (cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , diacil-glicerolo) attivato in seguito all'attivazione del recettore, attiva a sua volta numerose altre chinasi che fosforilano substrati intracellulari determinando una condizione di generale iporesponsività cellulare. Nel caso specifico dei  $\beta 2$ -Ars, la loro attivazione si associa ad un aumento dei livelli citosolici di cAMP con successiva attivazione della PKA; tale chinasi fosforila il recettore a livello del suo C-terminale, favorendone la desensibilizzazione.
- **Desensibilizzazione omologa:** che invece richiede il legame dell'agonista al recettore, ed è mediata dalle GRKs.

#### *G-protein-coupled receptors kinases (GRKs) e GRK2*

GRK2 è un membro della famiglia delle serino-treonino chinasi regolatrici dei recettori sette tratti-transmembrana associate a proteine G (GPCR). Il loro ruolo è di fosforilare l'estremità C-terminale del dominio intracellulare (nel tratto corrispondente al terzo loop intracellulare, tra il V e il VI dominio ad alfa-elica) del recettore nella sua forma attivata, regolandone in questo modo la desensitizzazione e la successiva internalizzazione con un meccanismo basato sul reclutamento della beta-arrestina intracellulare.

Tra i membri della famiglia, GRK2 è quello che ha riscosso il maggior interesse nel panorama scientifico in quanto coinvolto nella modulazione della risposta cellulare in numerosi contesti fisiologici, sia tramite fosforilazione di substrati non-recettoriali, sia tramite interazione diretta con molecole coinvolte nel “signaling” intracellulare.



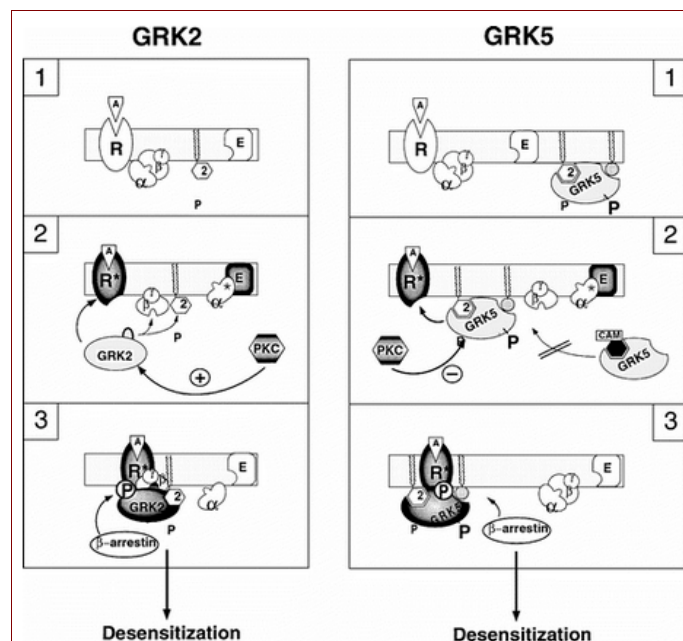
Nell'uomo sono state identificate, ad oggi, sette isoforme differenti di GRK e classificate in tre sottogruppi: GRK1-like a cui appartengono GRK1 e GRK7 coinvolti nella regolazione dei fotorecettori retinici; GRK2-like a cui appartengono GRK2 e GRK3 con espressione ubiquitaria; GRK4-like a cui appartengono GRK4 espresso a livello testicolare, cerebellare e renale, e GRK5 e GRK6 che hanno invece espressione ubiquitaria.

Il reclutamento della beta-arrestina mediato dai membri della famiglia GRK ed il suo legame con il recettore associato a proteina G svolge un ruolo fondamentale in diversi aspetti della trasmissione del segnale GPCR-mediato. La conseguenza principale è quella della rapida desensitizzazione recettoriale; inoltre, mediante l'interazione con altri mediatori dell'endocitosi quali la Clatrina e le Adattine, la beta-arrestina è in grado di portare rapidamente all'internalizzazione del recettore. Come proteina scaffold, la beta-arrestina attivata dalle GRK interagisce anche con differenti mediatori della trasduzione del segnale, tra cui i principali sono i membri della famiglia delle MAPK, mediando in questo modo processi fondamentali della biologia cellulare quali la motilità cellulare, la chemiotassi e la sopravvivenza cellulare.

#### *Attivazione e regolazione di GRK2*

GRK2, a differenza di altri membri della stessa famiglia come ad esempio GRK5, non è strettamente adesa alla membrana plasmatica, ma ha localizzazione citosolica; essa è in grado di traslocare a livello della membrana solo quando la cellula è adeguatamente stimolata da agonisti recettoriali.

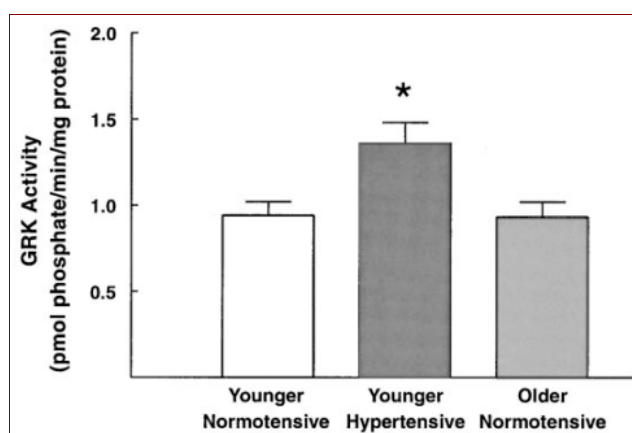
Una volta che il GPCR è stato attivato dall'agonista, quindi, GRK2 trasloca in membrana e lega il recettore mediante interazione con il fosfatidil-inositolo-2-fosfato (PIP2) e con il complesso  $\beta\gamma$  della G-protein.



**Figura 2.** Differenze nel meccanismo d'azione di GRK2 e GRK5. GRK2, dopo l'attivazione recettoriale, trasloca dal citosol in membrana ed interagisce con il complesso  $\beta\gamma$  della G-protein; GRK5, invece, è già ancorato in membrana.

### Ruolo di GRK2 nella patologia ipertensiva

Un aumento dei livelli circolanti di GRK2 viene considerato marcatore caratteristico di diverse patologie cardiovascolari, tra cui l'ipertensione arteriosa. In particolare, i livelli di GRK2 sono aumentati tanto nell'ipertensione umana, quanto in quella indotta nel modello animale murino.



**Figura 3.** Determinazione quali-quantitativa dei livelli di proteine della famiglia GRK in pazienti normotesi confrontati con pazienti ipertesi.

Allo stesso modo, la creazione di un modello transgenico murino con overespressione selettiva a livello vascolare di GRK2 si associa alla comparsa d'ipertensione la quale, a sua volta, è responsabile della comparsa d'ipertrofia cardiaca.

Questa relazione tra l'aumento dei livelli di GRK2 e la comparsa d'ipertensione sembrerebbe essere mediata dalla desensitizzazione, fosforilazione-mediata, di specifiche isoforme di recettori membri della famiglia dei Beta-adrenergici ( $\beta$ AR), ovvero i  $\beta$ 2. Il  $\beta$ 2 è infatti un recettore presente a livello della muscolatura liscia di alcuni apparati: muscolatura liscia bronchiale, muscolatura liscia gastrointestinale ed è inoltre presente sulla muscolatura liscia di coronarie e grandi vasi che irrorano la muscolatura scheletrica. L'attivazione di questo recettore genera il rilassamento della muscolatura tra cui il rilassamento bronchiale, gastrointestinale e dei grandi vasi periferici.

*a) Espressione linfocitaria di GRK2 in pazienti con gravidanze complicate da disturbi ipertensivi e correlazione con parametri clinici materni e fetali.*

## **OBIETTIVI**

Valutare i livelli di GRK2 in linfociti estratti da campioni di sangue materno e le relative modificazioni di espressione in risposta alla terapia, per valutare la possibilità di utilizzo di GRK2 come biomarcatore per l'outcome materno-fetale in gravidanze complicate da disturbi ipertensivi.

## **MATERIALI E METODI**

### **Scelta del campione**

In un periodo di osservazione di circa un anno (Maggio 2012 – Giugno 2013) sono state reclutate 20 pazienti gravide ipertese e 12 donne gravide normotese e con anamnesi negativa, in caso di pluriparità, per pregressa ipertensione gestazionale, per un totale di 39 prelievi totali. Tutte le pazienti reclutate sono state seguite presso l'area funzionale di Emergenze Ostetriche e Ginecologiche del Dipartimento ad Attività Integrata di Ostetricia, Ginecologia ed Urologia dell'AOU "Federico II" di Napoli ed hanno sottoscritto un consenso informato.

Il gruppo delle pazienti ipertese è stato composto da:

- Pazienti con ipertensione gestazionale
- Pazienti con ipertensione cronica

In questo gruppo, la diagnosi di preeclampsia è stata confermata come:

- Preeclampsia de-novo: Comparsa di proteinuria maggiore/uguale di 300mg/24h
- Preeclampsia sovrapposta ad ipertensione cronica: sviluppo di preeclampsia o eclampsia in una paziente con ipertensione cronica o vasculopatia o nefropatia, con presenza di proteinuria significativa dopo 20 settimane di gestazione.

Abbiamo escluso dallo studio le pazienti che avevano:

- NT alterato;
- Presenza di malformazioni fetali riscontrate ecograficamente;
- Presenza di cromosomopatie;
- Infezioni materne;
- Gravidanze gemellari.

## **Monitoraggio**

Alle pazienti arruolate è stata garantita l'esecuzione di:

- attenta valutazione clinico-ostetrica (compresa la misurazione del peso corporeo e la determinazione del BMI);
- misurazione della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa;
- esecuzione di esami ematochimici: esame emocromocitometrico, esami sierologici (determinazione degli elettroliti sierici, glicemia, profilo lipidico, test di funzionalità epatica e renale), prove di coagulazione;
- ecografia trans-addominale per determinazione della biometria fetale, del liquido amniotico, dei movimenti fetali e per la valutazione delle flussimetrie fetali mediante Color- e Power-doppler;
- esame cardiotocografico;

Le pazienti seguite durante il ricovero in degenza, sono state continuamente monitorizzate mediante:

- controlli cardiotocografici quotidiani;
- controlli ecografici delle flussimetrie fetali seriati a distanza di circa 3 giorni;
- controlli ecografici della biometria fetale seriati a distanza di circa 10-15 giorni;
- misurazione del peso corporeo una volta a settimana;
- misurazioni della pressione arteriosa ripetute nell'arco della giornata;
- esame emocromocitometrico, esame delle urine e proteinuria delle 24 ore una volta a settimana.

## **Timing e modalità dei prelievi**

Alle pazienti, in fase di presentazione dello studio, sono state chiarite modalità e tempistiche di esecuzione dei prelievi: è stata richiesta l'esecuzione di un prelievo ematico in ogni trimestre di gravidanza ed immediatamente dopo il parto.

L'esecuzione di tali prelievi è stata affidata al personale medico-sanitario della nostra struttura ospedaliera.

### **Raccolta dei dati**

Tutti i dati utilizzati nella nostra analisi derivano dallo studio delle cartelle cliniche in cui, per ogni paziente, sono stati meticolosamente raccolti: dati anagrafici, dati anamnestici remoti e prossimi, dati relativi all'anamnesi ostetrico-ginecologica, i principali fattori di rischio relativi al possibile sviluppo di patologia ipertensiva in gravidanza, l'evoluzione clinica, ecografica ed ematochimica dell'eventuale gravidanza, e l'outcome della stessa.

### **Estrazione di linfociti da sangue periferico**

Sono stati prelevati circa 20ml di sangue periferico, in presenza di anticoagulante (EDTA), dai soggetti in esame. Successivamente, sono stati isolati i linfociti mediante purificazione su gradiente di Ficoll (Histopaque 1077 Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri)<sup>73 71</sup>. L'anello linfocitario ottenuto, è stato prelevato ed i linfociti sono stati lavati in un tampone fosfato salino (PBS). Per ottenere la completa rimozione dei globuli rossi, è stata effettuata un'incubazione con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  per 5 minuti. I linfociti ottenuti sono stati conservati a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **Analisi dei campioni mediante Western Blotting**

Per gli estratti di membrana, i linfociti sono stati lisati in MHLB pH 7.5 [25 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH8), 5mM EGTA]. Le proteine di membrana sono state ottenute dopo centrifugazione a 14000 rpm per 15 minuti e la concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il BIO-RAD protein assay. I lisati sono stati caricati su gel SDS/PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. La reazione è stata visualizzata utilizzando specifici anticorpi primari, anticorpi secondari HRP-coniugati (Santa Cruz Biotechnology) e chemiluminescenza (ECL Kit; Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). Le immagini sono state digitalizzate e l'analisi densitometrica è stata effettuata con l'utilizzo del software ImageQuant (ImageQuant;

Molecular Dynamics, Piscataway, New Jersey). Il confronto viene effettuato con la proteina  $G\alpha_i$  che, essendo codificata da un gene “House Keeping”, mantiene livelli di espressione costanti in tutto l’organismo e non è influenzata da meccanismi di regolazione esterni.

Tutti i dati seguenti sono riportati come “media $\pm$ DS” per le variabili continue e come “numero (percentuale)” per le variabili categoriche.

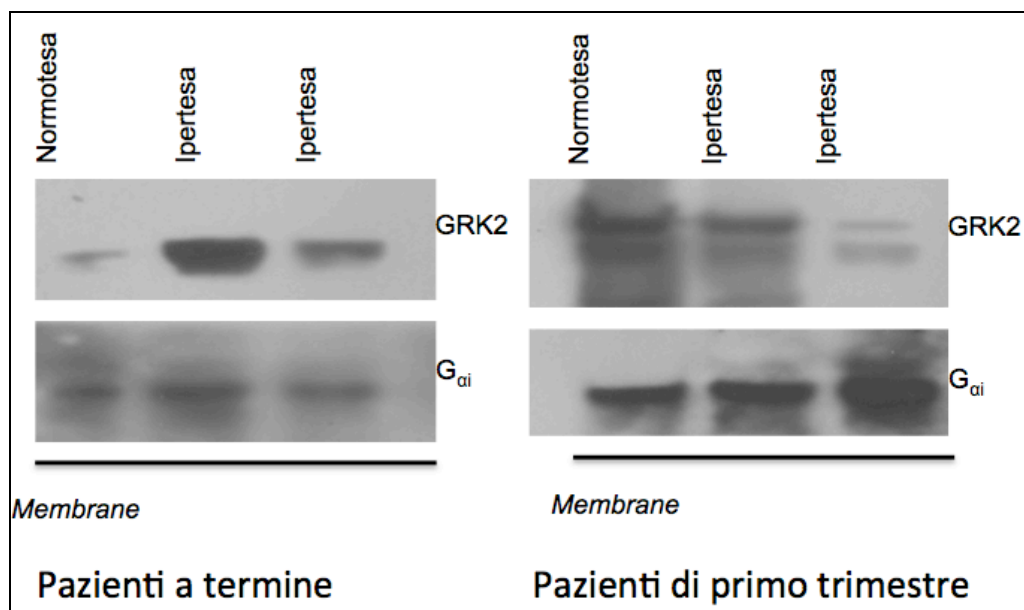
### **Analisi statistica dei dati**

Per l’analisi statistica dei dati è stato utilizzato SPSS 20 (INC., Chicago IL.). Le correlazioni statistiche tra i livelli di GRK2 e i parametri materno-fetali sono state studiate tramite analisi di regressione lineare e tramite la realizzazione di tabelle di contingenza e successivi test del Chi Quadro.

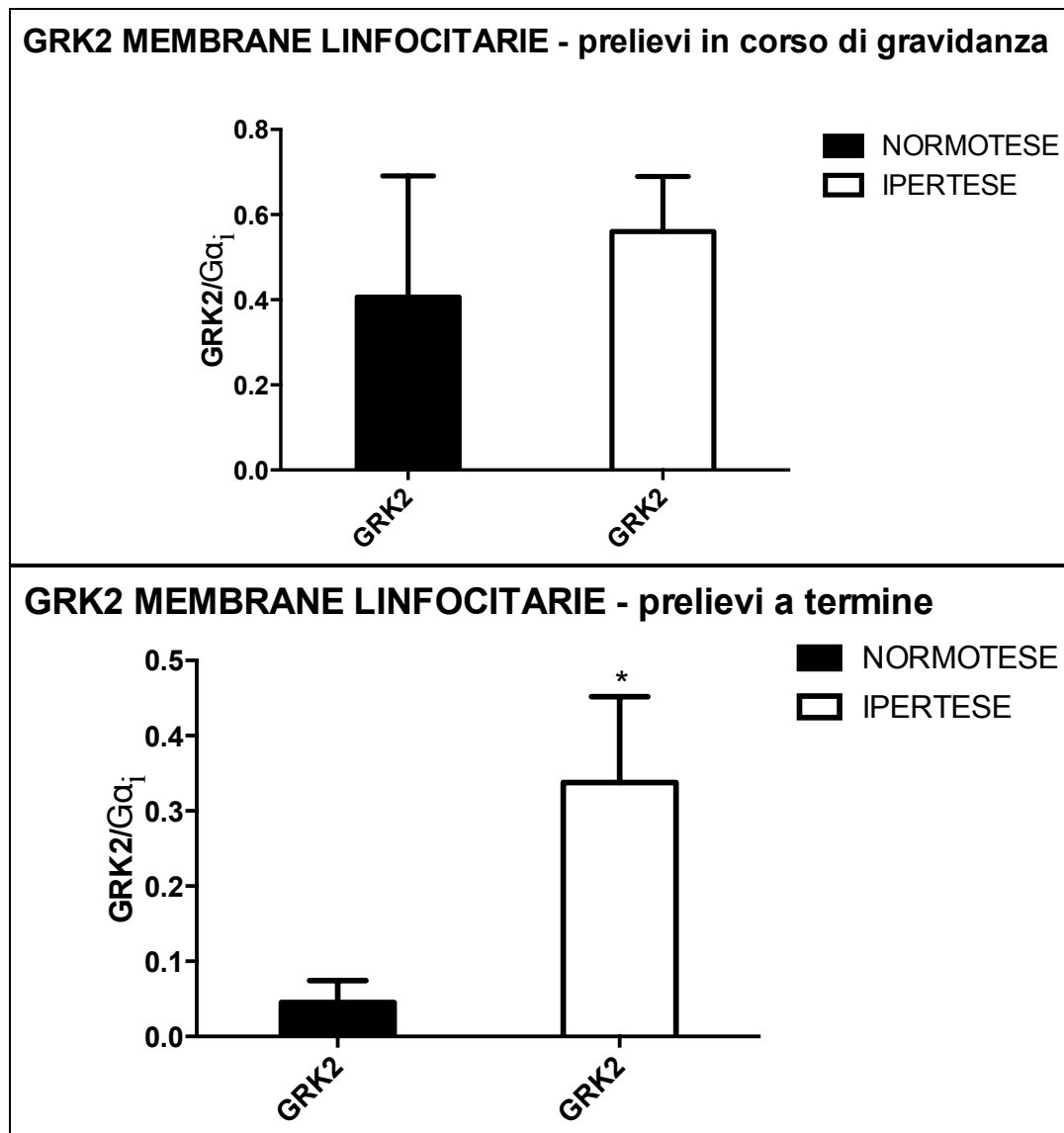


## RISULTATI

L'analisi densitometrica di GRK2 effettuata tramite Western Blot dei nostri campioni, ha dimostrato livelli più elevati nei casi rispetto ai controlli ( $0,33 \pm 0,11$  nei casi a termine di gravidanza contro  $0,04 \pm 0,02$  nei controlli a termine, con  $p = 0,001$  ;  $0,56 \pm 0,12$  nei casi durante la gravidanza contro  $0,40 \pm 0,28$  ). Tale osservazione si è dimostrata particolarmente valida per i prelievi effettuati a termine, in concomitanza del parto, piuttosto che per i prelievi effettuati nel primo o nel secondo trimestre di gravidanza. Nella **figura 17** sono riportate, come esempio, immagini di Western Blot caso/controllo derivanti da prelievi effettuati durante il primo trimestre della gravidanza ed al momento del parto: se nel prelievo effettuato al primo trimestre la differenza risulta essere appena o per nulla apprezzabile, essa risulta invece particolarmente evidente nel prelievo effettuato al momento del parto.



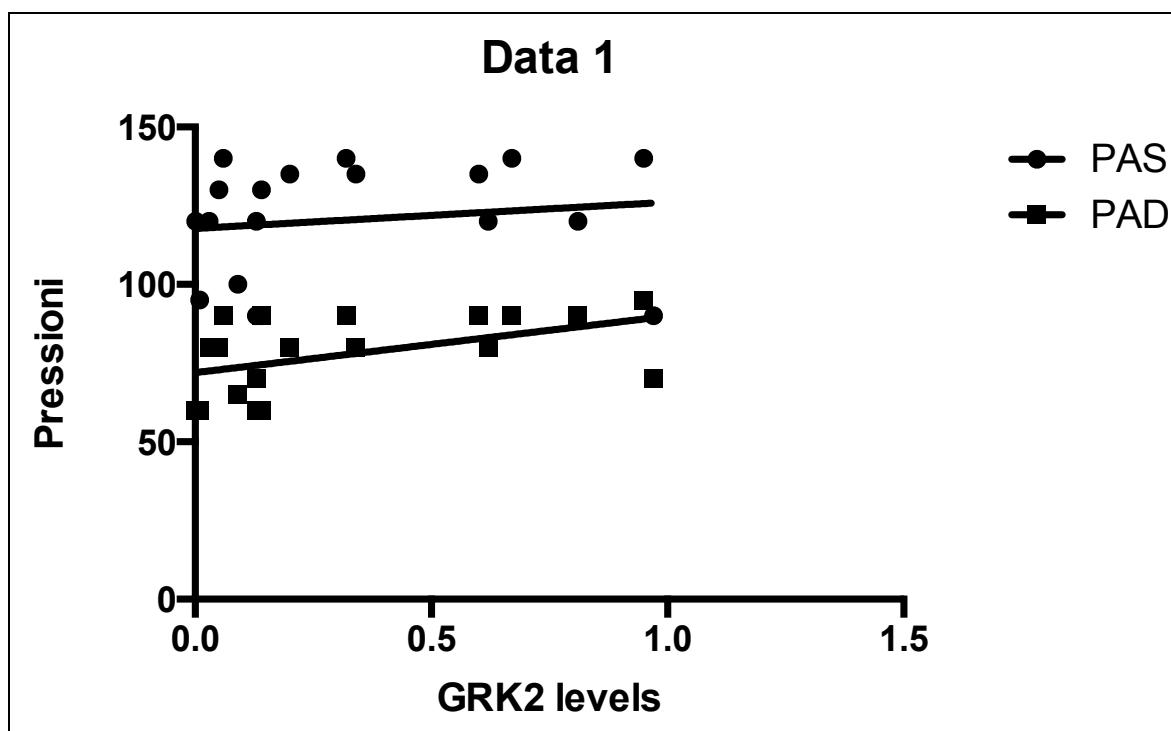
**Figura 4.** Analisi densitometrica di GRK2 in diversi periodi di gravidanza; immagini di Western Blot.



**Figura 5.** Rappresentazione grafica dell'andamento di GRK2 nei due gruppi caso/controllo a termine di gravidanza e durante la gravidanza. Vengono riportati il valore medio e la deviazione standard dei livelli di proteina nei due gruppi.  
\* $p < 0,05$

## GRK2 e parametri clinici materni

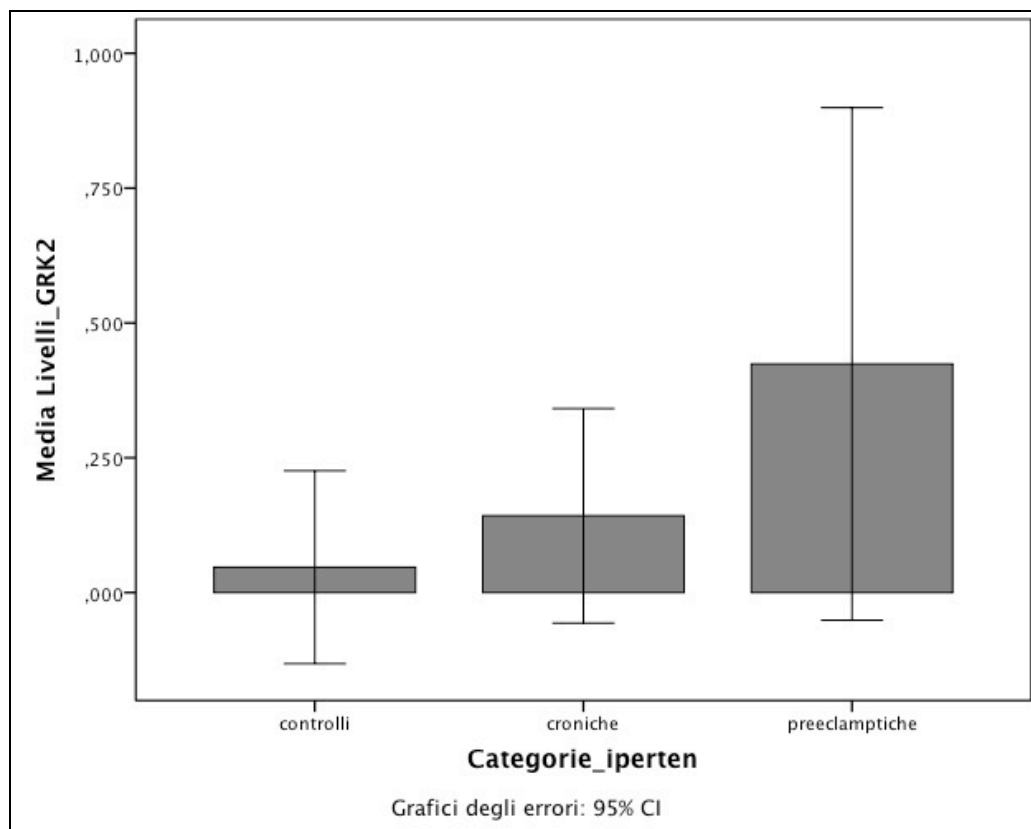
I livelli di GRK2 correlano positivamente, e sono in regressione lineare, con i valori di PAD ( $r^2 = 0,275$  ;  $p = 0,038$ ) (*Figura 19.*). Non esistono, invece, correlazioni statisticamente significative con gli altri parametri materni. Per quanto riguarda i valori di PAS, invece, nonostante non è stata raggiunta una correlazione statisticamente significativa mediante analisi di regressione lineare ( $r^2 = 0,02$  ;  $p = 0,54$ ), ciò è verosimilmente da attribuirsi al fatto che le pazienti considerate nel gruppo dei casi ricevano trattamenti farmacologici antipertensivi; questo dato può, verosimilmente, modificare i valori pressori riscontrati ed alterare il risultato statistico. Non è inoltre da sottovalutare l'ipotesi per cui, tale correlazione, possa apparentemente mancare a causa della scarsa numerosità campionaria a nostra disposizione.



*Figura 6. Regressione lineare tra i valori di GRK2 e quelli di PAD.*

Successivamente abbiamo stratificato la nostra popolazione di casi in due diversi gruppi: pazienti con ipertensione cronica/essenziale, e pazienti con ipertensione gestazionale/preeclampsia, così da ottenere tre diversi gruppi: il gruppo dei controlli

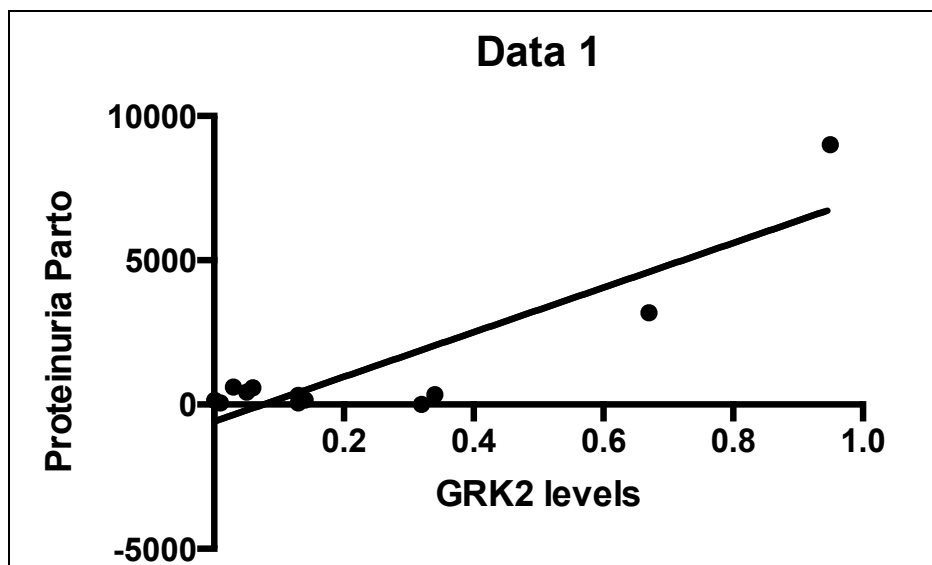
ed i due gruppi di casi; abbiamo così valutato se nei due gruppi di casi i livelli di GRK2 fossero differenti. L'esame statistico effettuato tramite Test di Mann-Whitney non è risultato statisticamente significativo ( $p = 0,3$ ), tuttavia è emersa una tendenza, nelle pazienti con ipertensione gestazionale/preeclampsia, ad avere livelli mediamente più elevati di GRK2 (valore medio  $0,424 \pm 0,382$  nel gruppo delle ipertese gestazionali/preeclamptiche vs.  $0,124 \pm 0,125$  nel gruppo delle ipertese croniche/essenziali) (**Figura 20**). Tale dato dovrà, pertanto, essere rivalutato all'aumentare della numerosità campionaria.



**Figura 7.** Valori medi e deviazioni standard nei 3 gruppi di pazienti: controlli, ipertese croniche, ipertese gestazionali/preeclamptiche.

## GRK2 e proteinuria

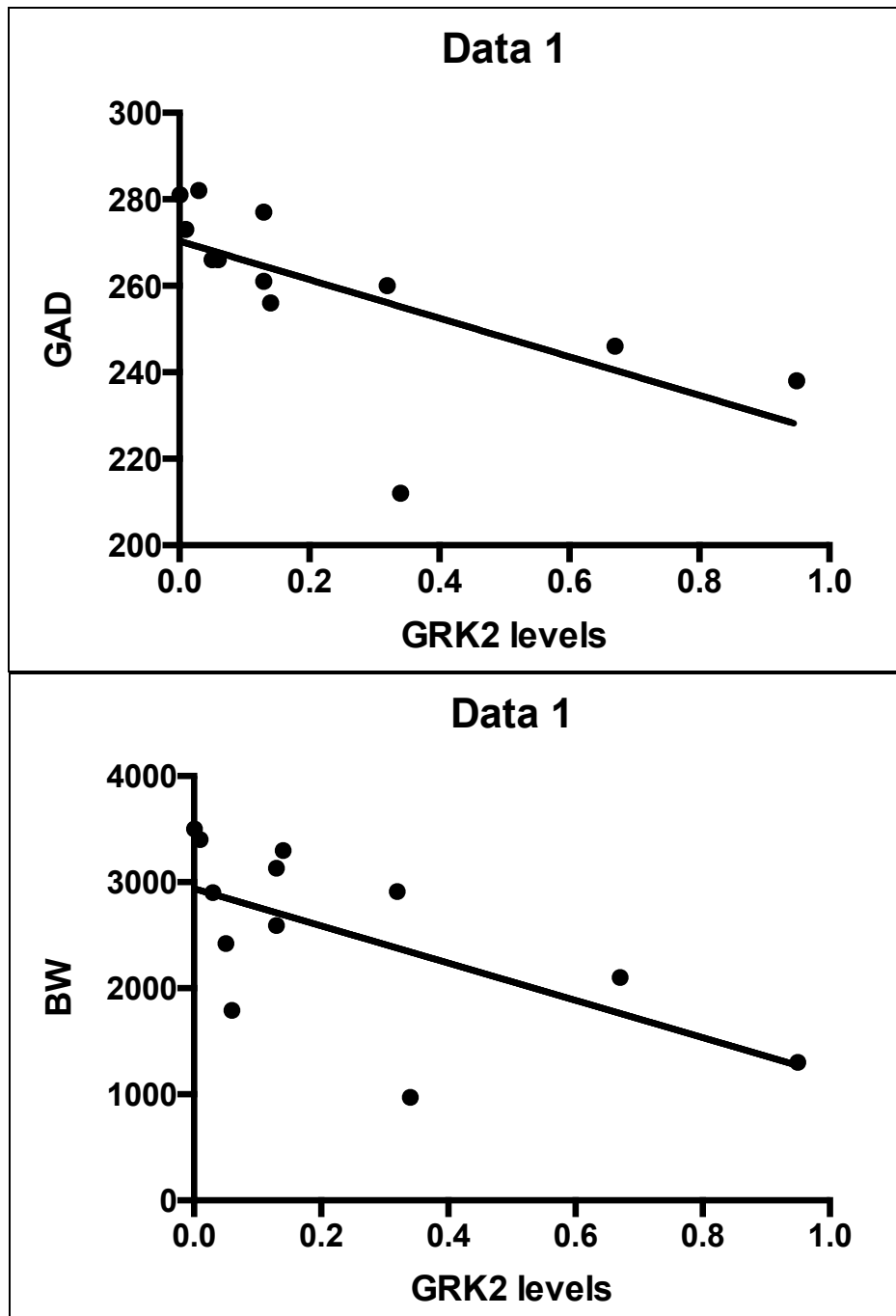
Siamo andati a valutare i livelli di proteinuria al parto e la loro correlazione con i livelli di GRK2. L'analisi tramite regressione lineare ha rilevato, per questo parametro, una considerevole significatività statistica ( $r^2 = 0,7786$  ;  $p = 0,0001$ ) (*Figura 21.*)



**Figura 8.** Rappresentazione della regressione lineare tra valori di proteinuria al parto e livelli di GRK2; rappresentazione grafica mediante scatter-gramma.

### GRK2 ed outcome fetale

I valori di GRK2 correlano in maniera significativa, analizzata mediante regressione lineare, sia con l'epoca gestazionale ( GAD;  $r^2 = 0,421$  ;  $p = 0,02$  ) , sia con il peso neonatale (BW;  $r^2 = 0,389$  ;  $p = 0,03$  ) (*Figura 22.*).



**Figura 9.** Scatter-gramma dei valori di GRK2 correlati con le epoche gestazionali al parto (GAD) e con il peso neonatale (BW).

## DISCUSSIONE

Nonostante il forte interesse, dovuto soprattutto al sempre maggiore impatto della malattia sull'outcome delle gravidanze ad alto rischio, non si è ancora giunti ad una teoria univoca sull'eziopatogenesi della preeclampsia. Recentemente l'interesse si è spostato sul ruolo giocato dal sistema adrenergico nei disordini ipertensivi: in particolare, una disregolazione del sistema adrenergico sembra essere coinvolta nello sviluppo della patologia preeclamptica. Sulla base degli studi precedentemente condotti presso il Nostro Dipartimento, abbiamo deciso di analizzare i livelli circolanti linfocitari di GRK2 in campioni di sangue periferico venoso materno, per confermare l'importanza di tale elemento nella patogenesi della preeclampsia. La nostra analisi ha confermato i dati ottenuti negli studi precedenti, rinforzando l'idea per cui GRK2 può essere un biomarker sensibile per monitorare il benessere materno e l'outcome fetale in gravidanze complicate da ipertensione. Tale dato ha una forza statistica particolarmente rilevante al termine della gravidanza, mentre la significatività viene meno nelle fasi iniziali della gravidanza stessa; tuttavia, tale dato, potrebbe essere attribuito principalmente alla scarsa numerosità campionaria a nostra disposizione.

Si è visto che i livelli di GRK2 correlano con parametri materni quali la proteinuria e la pressione arteriosa diastolica, mentre manca una correlazione rilevante con la pressione arteriosa sistolica e con gli altri parametri clinici materni. I livelli di GRK2, inoltre, correlano con parametri fondamentali per il monitoraggio dell'outcome fetale quali l'epoca gestazionale al parto e il peso neonatale.

Si è deciso di valutare proprio GRK2 perchè, rispetto ad altri membri della famiglia delle GRKs, presenta un'espressione ubiquitaria, motivo per cui risulta meglio e più facilmente dosabile. Studi preesistenti, inoltre, hanno dimostrato che GRK2 è espressa in concentrazioni maggiori rispetto alle altre GRKs, risultando così più facilmente isolabile e quantificabile; è stato inoltre ben documentato il coinvolgimento della isoforma GRK2 in numerose patologie cardiovascolari.

Resta tuttavia da indagare il ruolo svolto dall'aumento dei livelli di GRK2: l'aumento di GRK2 è alla base della disregolazione adrenergica che si riscontra nella patologia ipertensiva, o è piuttosto conseguenza di un meccanismo adattativo? Quello che si può ipotizzare, infatti, è che nella preeclampsia (così come nella patologia ipertensiva in generale) accada qualcosa di simile a quello che si è riscontrato nello scompenso cardiaco. Nell'insufficienza cardiaca cronica, infatti, i cardiomiociti rispondono ad una disfunzione del ventricolo aumentando l'espressione in membrana dei recettori  $\beta_1$ AR, che sono i responsabili dell'aumentata contrattilità cardiaca; questo aumento della densità di espressione recettoriale può, in acuto, garantire una aumentata risposta miocardica, ma alla lunga finisce con l'aggravare il quadro clinico perché, aumentando la quota di recettori attivati, aumenta anche la quota di recettori che vanno incontro a desensibilizzazione. In parallelo, nella patologia ipertensiva, le cellule muscolari lisce vasali potrebbero rispondere aumentando la densità di espressione dei recettori  $\beta_2$ AR per migliorare la risposta vasodilatante; questa ipotesi troverebbe conferma dall'osservazione che, per il reclutamento e l'attivazione di GRK2, è necessario che l'AR sia in forma attivata; pertanto, se vengono riscontrati elevati livelli di GRK2, è verosimile che deve esserci stato un momento in cui nello stesso sito devono esserci stati numerosi  $\beta_2$ AR attivati. Anche qui, però, col tempo questa massiva attivazione dei  $\beta_2$ AR lascerà spazio ad una aumentata down-regolazione; questo farà sì che la risposta vasodilatante compensatoria venga meno, favorendo l'evoluzione verso lo scompenso.

In base a quanto emerso dal nostro studio, in virtù della mancanza di significatività nell'incremento di GRK2 nel primo trimestre di gravidanza e della spiccata significatività nell'incremento di GRK2 nelle pazienti ipertese a termine di gravidanza, si può supporre che l'espressione di GRK2 aumenti come meccanismo adattativo in risposta allo stress vascolare, ed al successivo massivo reclutamento dei recettori  $\beta_2$ AR.

La conferma di un ruolo patogenetico di GRK2 nei disturbi ipertensivi in gravidanza potrebbe avere enormi risvolti clinici e terapeutici; infatti, date le scarse possibilità



terapeutiche fin qui disponibili, sarebbe interessante indirizzare la ricerca verso molecole volte a bloccare il pathway patologico di GRK2.

I principali limiti dello studio sono legati a:

- la scarsa numerosità campionaria: motivo per cui, i risultati ottenuti, andrebbero confermati su campioni più ampi;
- l'eterogeneità nella gestione delle pazienti stesse, sia in termini di terapia farmacologica, sia in termini di monitoraggio biochimico ed ecografico, sia in termini di timing e modalità del parto.

## CONCLUSIONI

GRK2 è espresso in maniera significativamente maggiore in gravidanze complicate da disturbi ipertensivi; tale espressione, tuttavia, si modifica in maniera sensibile durante il corso della gravidanza, raggiungendo il massimo valore nelle fasi terminali della gravidanza stessa, e particolarmente in corrispondenza e nell'immediata successione del parto.

I suoi livelli sono indicativi della severità della compromissione materna, e verosimilmente anche dell'outcome fetale.

Per quanto il nostro studio confermi l'ipotesi di un ruolo della disregolazione del sistema adrenergico alla base di patologie correlate alla gravidanza come la preeclampsia, ulteriori studi sono necessari per supportare tale tesi.

La conferma di un ruolo dell'alterata espressione delle GRK-2 nella PE potrebbe aprire la strada alla ricerca di strategie terapeutiche volte ad intervenire su tale pathway patologico.

## BIBLIOGRAFIA

Briery CM The Merk Manual. (2008).

Maternal Mortality in 2005 Estimates developed by WHO, UNICEF, UNFPA and The World Bank. Geneva (2007).at <[http://www.who.int/whosis/mme\\_2005.pdf](http://www.who.int/whosis/mme_2005.pdf)>

Duley, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. Seminars in perinatology **33**, 130–7 (2009).

WHO | The World Health Report 2005 - make every mother and child count. at <<http://www.who.int/whr/2005/en/>>

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. American Journal of Obstetrics and Gynecology **183**, S1–S22 (2000).

ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics **77**, 67–75 (2002).

Napolitano, R., Santo, S., D'Souza, R., Bhide, A. & Thilaganathan, B. Sensitivity of higher, lower and mean second-trimester uterine artery Doppler resistance indices in screening for pre-eclampsia. Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology **36**, 573–6 (2010).

Nicola Rizzo, Adriana Valcamonico, Tiziana Frusca, Giuliana Simonazzi, Chiara Benedetto, Luca Marozio, Giorgio Mello, Andrea L. Tranquilli, Sergio Ferrazzani, Herbert Valensise, B. V. Linee guida per il management dell'ipertensione in gravidanza. (2007).

Sibai, B., Dekker, G. & Kupferminc, M. Pre-eclampsia. Lancet **365**, 785–99

Baschat, A. A. Fetal growth restriction - from observation to intervention. Journal of perinatal medicine **38**, 239–46 (2010).

Bamberg, C. & Kalache, K. D. Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. Seminars in fetal & neonatal medicine **9**, 387–94 (2004).

Serena, C. et al. Stillbirth and fetal growth restriction. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal

Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians **26**, 16–20 (2013).

Baschat, A. A. et al. Doppler and biophysical assessment in growth restricted fetuses: distribution of test results. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **27**, 41–7 (2006).

Melchiorre, K., Leslie, K., Prefumo, F., Bhide, A. & Thilaganathan, B. First-trimester uterine artery Doppler indices in the prediction of small-for-gestational age pregnancy and intrauterine growth restriction. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **33**, 524–9 (2009).

Miller, J., Turan, S. & Baschat, A. A. Fetal growth restriction. *Seminars in perinatology* **32**, 274–80 (2008).

Llurba, E. et al. Maternal history and uterine artery Doppler in the assessment of risk for development of early- and late-onset preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Obstetrics and gynecology international* **2009**, 275613 (2009).

Roberts, J. M. & Escudero, C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy hypertension* **2**, 72–83 (2012).

Powers, R. W. et al. Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. *PloS one* **5**, e13263 (2010).

Uzan, J., Carbonnel, M., Piconne, O., Asmar, R. & Ayoubi, J.-M. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular health and risk management* **7**, 467–74 (2011).

Mustafa, R., Ahmed, S., Gupta, A. & Venuto, R. C. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. *Journal of pregnancy* **2012**, 105918 (2012).

Rang, S., Wolf, H., Montfrans, G. A. & Karemaker, J. M. Non-invasive assessment of autonomic cardiovascular control in normal human pregnancy and pregnancy-associated hypertensive disorders: a review. *Journal of hypertension* **20**, 2111–9 (2002).

Aune, B., Vartun, A., Oian, P. & Sager, G. Evidence of dysfunctional beta2-adrenoceptor signal system in pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **107**, 116–121 (2000).

- DENNEDY, M., HOULIHAN, D., MCMILLAN, H. & MORRISON, J.  $\beta$ - and  $\beta$ -Adrenoreceptor agonists: Human myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **187**, 641–647 (2002).
- Hynes, P. G., Friel, A. M., Smith, T. J. & Morrison, J. J. Beta-adrenoceptor subtype expression in human placenta and umbilical arteries in normal and preeclamptic pregnancies. *Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* **27**, 169–81 (2008).
- Kristiansen, K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics* **103**, 21–80 (2004).
- Jurado-Pueyo, M., Campos, P. M., Mayor, F. & Murga, C. GRK2-dependent desensitization downstream of G proteins. *Journal of receptor and signal transduction research* **28**, 59–70 (2008).
- Evron, T., Daigle, T. L. & Caron, M. G. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends in pharmacological sciences* **33**, 154–64 (2012).
- Santulli, G., Trimarco, B. & Iaccarino, G. G-protein-coupled receptor kinase 2 and hypertension : molecular insights and pathophysiological mechanisms. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension* **20**, 5–12 (2013).
- Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *The Biochemical journal* **375**, 503–15 (2003).
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. *Annual review of biochemistry* **67**, 653–92 (1998).
- Gros, R. et al. G-Protein-Coupled Receptor Kinase Activity in Hypertension : Increased Vascular and Lymphocyte G-Protein Receptor Kinase-2 Protein Expression. *Hypertension* **35**, 38–42 (2000).
- Eckhart, A. D. Vascular-Targeted Overexpression of G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 in Transgenic Mice Attenuates beta -Adrenergic Receptor Signaling and Increases Resting Blood Pressure. *Molecular Pharmacology* **61**, 749–758 (2002).
- Izzo, R. et al. Enhanced GRK2 expression and desensitization of betaAR vasodilatation in hypertensive patients. *Clinical and translational science* **1**, 215–20 (2008).

Napolitano, R. et al. GRK2 levels in umbilical arteries of pregnancies complicated by gestational hypertension and preeclampsia. *American journal of hypertension* **25**, 366–71 (2012).

Iaccarino, G. et al. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *European heart journal* **26**, 1752–8 (2005).

Sorriento, D. et al. The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17818–23 (2008).

Iaccarino, G. et al. AKT participates in endothelial dysfunction in hypertension. *Circulation* **109**, 2587–93 (2004).

Lasorella, A. et al. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* **442**, 471–4 (2006).

Santulli, G. et al. In vivo properties of the proangiogenic peptide QK. *Journal of translational medicine* **7**, 41 (2009).

Rouget, C. et al. Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia. *Biology of reproduction* **74**, 209–16 (2006).

Zhang, C., Williams, M. A., Edwards, K. L. & Austin, M. A. Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene, pre-pregnancy obesity and risk of pre-eclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* **17**, 19–28 (2005).

Cohn, H. I. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans. *Hypertension* **54**, 71–6 (2009).

***b) Espressione linfocitaria di GRK2 in pazienti con gravidanze complicate da disordini ipertensivi e correlazione con l'outcome neurologico fetale.***

## **OBIETTIVI**

Valutare i livelli di GRK2 in linfociti estratti da campioni di sangue materno di donne con disturbi ipertensivi e confrontarli con quelli di controlli fisiologici, nel primo trimestre ed al momento del parto. Ricercare correlazioni tra i livelli di GRK2 e l'outcome neurologico fetale.

## **MATERIALI E METODI**

### **Scelta del campione**

Sono state reclutate 15 pazienti gravide ipertese e 10 normotese e con anamnesi negativa, in caso di pluriparità, per pregressa ipertensione gestazionale.

Tutte le pazienti reclutate, sono state seguite presso l'area funzionale di Emergenze Ostetriche e Ginecologiche del Dipartimento ad Attività Integrata di Ostetricia, Ginecologia ed Urologia dell'AOU "Federico II" di Napoli ed hanno sottoscritto un consenso informato, da luglio 2013 a ottobre 2014.

I casi includevano pazienti con ipertensione gestazionale o con ipertensione cronica; in questo gruppo, la diagnosi di preeclampsia è stata confermata come:

- *preeclampsia de-novo* (comparsa di proteinuria  $\geq 0.3$  g / 24 ore, o rapporto proteine:creatinina urinarie  $\geq 30$  mg/mmol);
- *preeclampsia sovrapposta ad ipertensione cronica* (comparsa di proteinuria significativa dopo 20 settimane di gestazione, oppure di un improvviso peggioramento dell'ipertensione e della proteinuria in gestanti già affette).

Criteri di esclusione sono stati:

- NT alterata.
- Presenza di malformazioni fetali riscontrate eco graficamente.
- Presenza di cromosomopatie.
- Infezioni materne.
- Gravidanze gemellari.

### **Monitoraggio**

Alle pazienti arruolate è stata garantita l'esecuzione di:

- attenta valutazione clinico-ostetrica;
- misurazione del peso corporeo, determinazione dell'altezza e successivo calcolo del BMI;



- misurazione della frequenza cardiaca;
- misurazione della pressione arteriosa;
- esecuzione di esami ematochimici: esame emocromocitometrico, esami sierologici (determinazione degli elettroliti sierici, glicemia, profilo lipidico, test di funzionalità epatica e renale), prove di coagulazione;
- ecografia trans-addominale per determinazione della biometria fetale, del liquido amniotico, dei movimenti fetali e per la valutazione delle flussimetrie fetali mediante Color- e Power-doppler;
- esame cardiotocografico;

Le pazienti seguite durante il ricovero in degenza, sono state continuamente monitorizzate mediante:

- controlli cardiotocografici quotidiani;
- controlli ecografici delle flussimetrie fetali seriati a distanza di circa 3 giorni;
- controlli ecografici della biometria fetale seriati a distanza di circa 10-15 giorni;
- misurazione del peso corporeo una volta a settimana;
- misurazioni della pressione arteriosa ripetute nell'arco della giornata;
- esame emocromocitometrico, esame delle urine e proteinuria delle 24 ore una volta a settimana.

### **Timing e modalità dei prelievi**

Alle pazienti, in fase di presentazione dello studio, sono state chiarite modalità e tempistiche di esecuzione dei prelievi: è stata richiesta l'esecuzione di un prelievo ematico al momento del reclutamento nel primo trimestre di gravidanza ed il giorno del parto. L'esecuzione del prelievo venoso è stata affidata al personale medico-sanitario della nostra struttura ospedaliera e generalmente attuato per puntura delle vene cubitali alla piega del gomito.

## **Raccolta dei dati**

I dati raccolti per ciascuna paziente sono stati registrati su un database dedicato; essi includevano: dati anagrafici, dati anamnestici remoti e prossimi, dati relativi all'anamnesi ostetrico-ginecologica, presenza/assenza dei principali fattori di rischio relativi al possibile sviluppo di patologia ipertensiva in gravidanza, dati clinici, dati ecografici, dati ematochimici ed outcome materno e fetale.

## **Estrazione di linfociti da sangue periferico**

Sono stati prelevati circa 20ml di sangue periferico, in presenza di anticoagulante (EDTA), dai soggetti in esame. Successivamente, sono stati isolati i linfociti mediante purificazione su gradiente di Ficoll (Histopaque 1077 Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri). L'anello linfocitario ottenuto, è stato prelevato ed i linfociti sono stati lavati in un tampone fosfato salino (PBS). Per ottenere la completa rimozione dei globuli rossi, è stata effettuata un'incubazione con NH<sub>4</sub>Cl per 5 minuti. I linfociti ottenuti sono stati conservati a -80°C.

## **Analisi dei campioni mediante Western Blot**

Per gli estratti di membrana, i linfociti sono stati lisati in MHLB pH 7.5 [25 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH8), 5mM EGTA]. Le proteine di membrana sono state ottenute dopo centrifugazione a 14000 rpm per 15 minuti e la concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il BIO-RAD protein assay. I lisati sono stati caricati su gel SDS/PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. La reazione è stata visualizzata utilizzando specifici anticorpi primari, anticorpi secondari HRP-coniugati (Santa Cruz Biotechnology) e chemiluminescenza (ECL Kit; Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). Le immagini sono state digitalizzate e l'analisi densitometrica è stata effettuata con l'utilizzo del software ImageQuant (ImageQuant; Molecular Dynamics, Piscataway, New Jersey). Il confronto viene effettuato con la

proteina Gai che, essendo codificata da un gene “House Keeping”, mantiene livelli di espressione costanti in tutto l’organismo e non è influenzata da meccanismi di regolazione esterni.

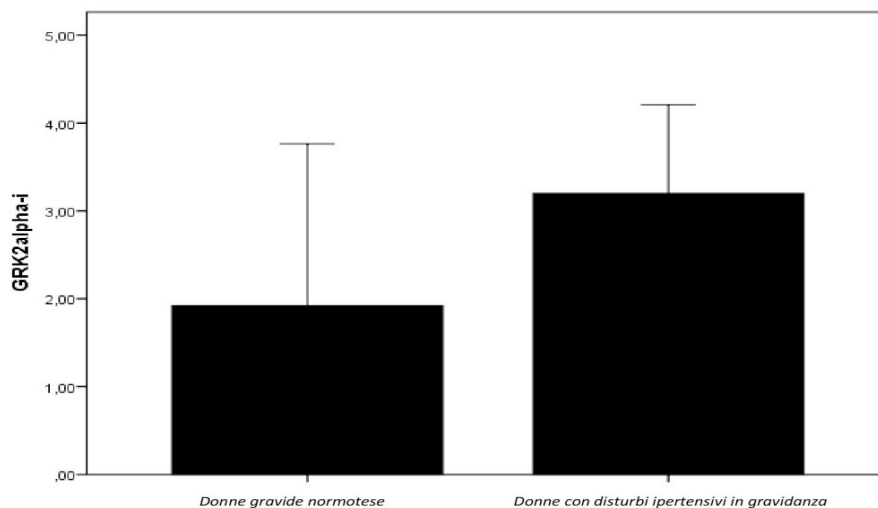
### **Analisi statistica dei dati**

Per l’analisi statistica dei dati è stato utilizzato SPSS 20 (INC., Chicago IL.). Tutti i dati sono stati riportati come  $\text{media} \pm \text{DS}$  per le variabili continue e come numero (percentuale) per le variabili categoriche. Valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

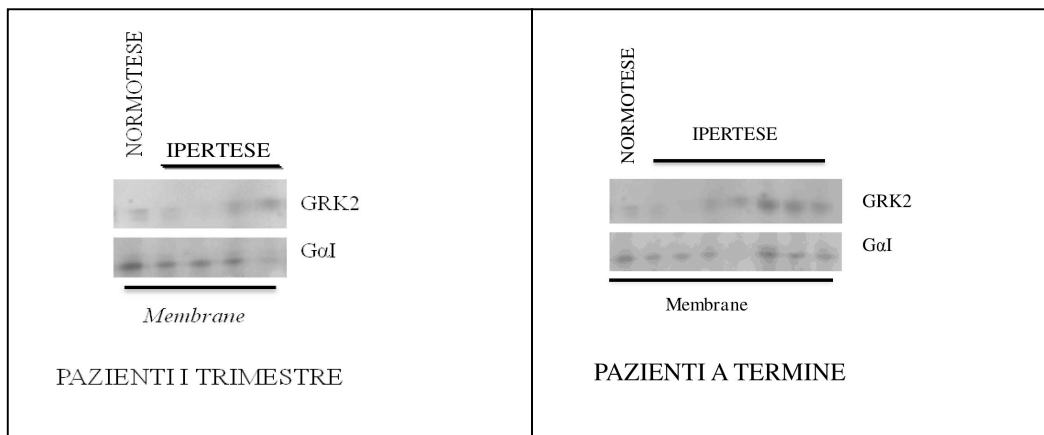
L'analisi densitometrica di GRK2 effettuata tramite Western Blot dei nostri campioni, non ha dimostrato differenze nell'espressione linfocitaria di GRK2 tra i casi ed i controlli nel prelievo fatto al reclutamento, in corso di primo trimestre di gravidanza.

Al contrario, al momento del parto, l'espressione linfocitaria di GRK2 è risultata maggiore nei casi rispetto ai controlli. ( $1.7 \pm 0.7$  vs  $2.5 \pm 0.5$ ). (**Figura 1**).



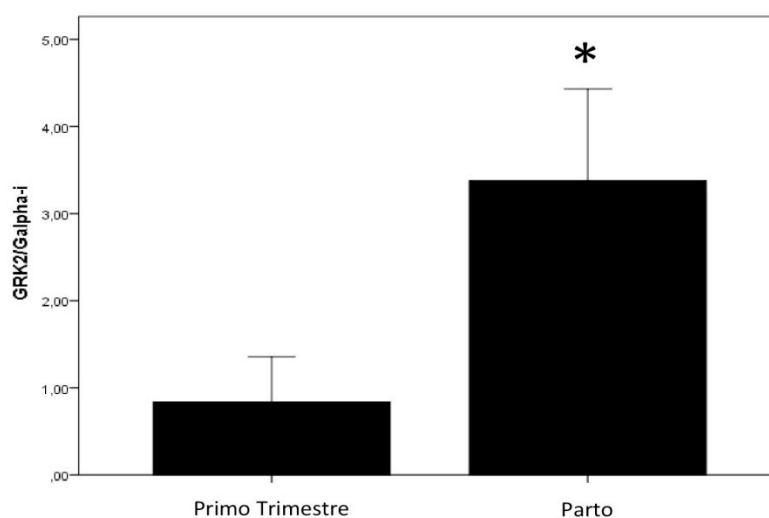
**Figura 1.** Differenza nei livelli di espressione di GRK2 al parto nei due gruppi caso/controllo di pazienti.

Nella **figura 2** sono riportate, come esempio, immagini di Western Blot caso/controllo derivanti da prelievi effettuati durante il primo ed il terzo trimestre di gravidanza: se nel prelievo effettuato al primo trimestre la differenza risulta essere appena o per nulla apprezzabile, essa risulta invece particolarmente evidente nel prelievo effettuato al momento del parto.



**Figura 2.** Analisi densitometrica di GRK2 in diversi periodi di gravidanza; immagini di Western Blot.

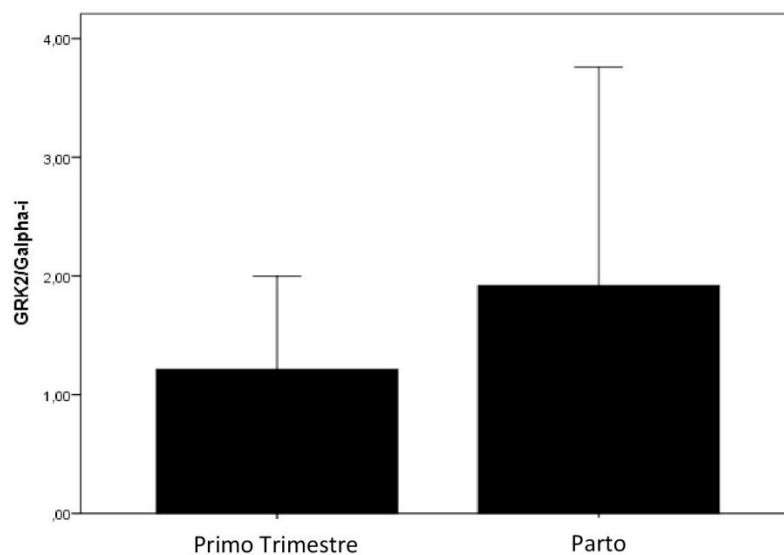
Abbiamo poi effettuato la media rispetto ai valori di GRK2 al primo trimestre e quelli al momento del parto nelle donne con gravidanze complicate da disturbi ipertensivi riscontrando un aumento statisticamente significativo dei livelli di GRK2 al parto rispetto ai livelli di GRK2 del primo trimestre. ( $0.9 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 0.5$ ;  $p < 0.005$ ). (Figura 3).



**Figura 3.** Rappresentazione grafica dell'andamento di GRK2 in donne con disturbi ipertensivi in gravidanza nel primo trimestre ed al parto.

$*p < 0,005$

Al contrario, nei controlli, la variazione dell'espressione di GRK2 tra il momento del reclutamento e il momento del parto non è risultata statisticamente significativa ( $1.2 \pm 0.3$ ;  $1.9 \pm 0.9$ ;  $p=0.5$ .) (**Figura 4**).

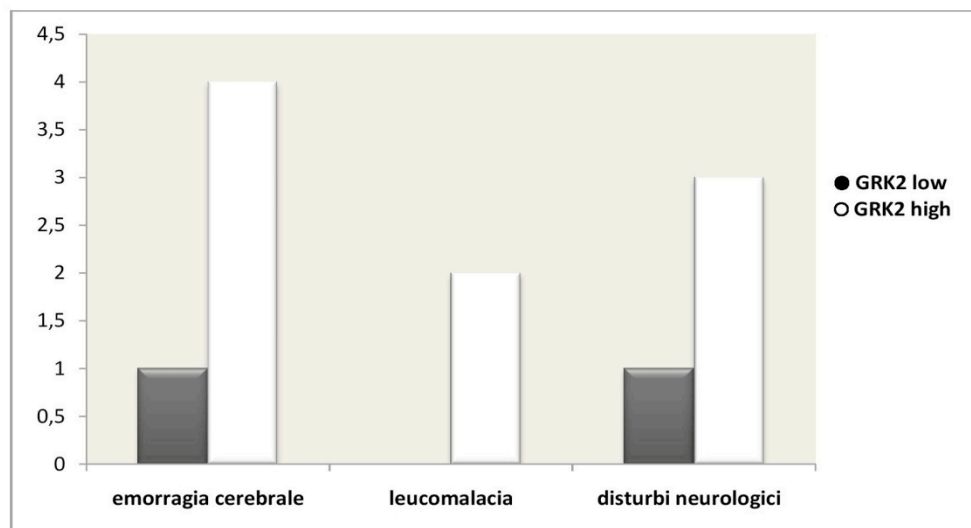


**Figura 4.** Rappresentazione grafica dell'andamento di GRK2 in donne gravide normotese nel primo trimestre ed al parto.

### GRK2 ed outcome neurologico neonatale

Dividendo il campione dei casi in due gruppi in base al valore mediano di GRK2 (3.09), abbiamo valutato l'outcome neonatale nei gruppi con bassi valori di GRK2 (*GRK2-low*) ed in quelli con alti valori di GRK2 (*GRK2-high*). (**Figura 5**).

Nelle pazienti con valori di GRK2 al di sopra del valore mediano, l'outcome neurologico neonatale è risultato essere più sfavorevole.



**Figura 5.** *Differenti esiti neurologici neonatali in base ai valori low o high di GRK2.*

## DISCUSSIONE

La nostra analisi ha confermato i dati ottenuti negli studi precedenti, dal momento che abbiamo riscontrato più alti livelli di GRK2 nelle gravidanze complicate da disturbi ipertensivi rispetto ai controlli fisiologici. Tale dato, però, è stato riscontrato soltanto al momento del parto, quando, cioè si sono già instaurate delle complicanze che hanno reso necessaria l'interruzione della gravidanza. Non si è riscontrata, invece, una differenza al primo trimestre di gravidanza; si è escluso, pertanto, un possibile ruolo di GRK2 come marker biochimico predittivo di disturbi ipertensivi della gravidanza. Dato molto interessante, è stato il riscontro, nei casi e non nei controlli, di un significativo aumento dei valori GRK2 al momento del parto, rispetto al primo trimestre. Questo ci fa ipotizzare che, nel corso della gravidanza, una modifica dell'espressione di GRK2 è coinvolta nella fisiopatologia dei disturbi ipertensivi della gravidanza. Resta tuttavia da indagare il ruolo svolto dall'aumento dei livelli di GRK2, ossia se l'aumento di GRK2 è alla base della disregolazione adrenergica che si riscontra nella patologia ipertensiva, o è piuttosto conseguenza di un meccanismo adattativo.

Nel nostro studio, alti livelli di GRK2 nelle gravidanze complicate da disturbi ipertensivi sono associati ad un outcome neurologico neonatale più sfavorevole, infatti nei casi in cui GRK2 era superiore al valore mediano, si sono verificate conseguenze quali emorragie cerebrali, leucomalacia e disturbi neurologici, facendoci ipotizzare come l'espressione della proteina potrebbe essere anche predittiva di esiti neonatali avversi.

La conferma di un ruolo patogenetico di GRK2 potrebbe avere enormi risvolti sia clinici che terapeutici; infatti, dato che le possibilità terapeutiche si limitano al controllo dei parametri pressori, sarebbe interessante indirizzare la ricerca verso molecole volte a bloccare il pathway patologico di GRK2 agendo così a monte del meccanismo fisiopatologico.

I principali limiti dello studio sono legati a:



- la scarsa numerosità campionaria: motivo per cui, i risultati ottenuti, andrebbero confermati su campioni più ampi
- l'eterogeneità nella gestione delle pazienti stesse, sia in termini di terapia farmacologica, sia in termini di monitoraggio biochimico ed ecografico, sia in termini di timing e modalità del parto.

## **CONCLUSIONI**

GRK2 è risultato essere aumentato nelle donne con gravidanze complicate da disturbi ipertensivi al momento del parto. Tale differenza non è stata riscontrata al momento del reclutamento nel primo trimestre. Nelle gravidanze complicate da disturbi ipertensivi della gravidanza, al contrario di quanto accade nelle gravidanze fisiologiche, si è riscontrato un aumento significativo dell'espressione di GRK2 dall'inizio della gravidanza al momento del parto, dimostrando un possibile ruolo di tale proteina nell'eziopatogenesi dei disturbi ipertensivi della gravidanza.

GRK2, inoltre, sembra essere predittivo di un outcome neurologico sfavorevole.

I nostri dati devono essere confermati da uno studio su un campione più ampio.

## BIBLIOGRAFIA

WHO. | Maternal Mortality. (2014).

Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs348/en/>

Valdiviezo, C., Garovic, V. D., & Ouyang, P. Preeclampsia and hypertensive disease in pregnancy: their contributions to cardiovascular risk. *Clinical Cardiology*, **35**(3). (2012).

Rizzo N., Valcamonico A., Frusca T., Simonazzi G., Benedetto C., Marozio L., Mello G., Tranquilli AL., Ferrazzani S., Valensise H., *Linee guida per il management dell'ipertensione in gravidanza*. (2007).

RCOG (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists). The management of severe pre-eclampsia/eclampsia. *Guideline n:10*. July (2006).

Sibai, B., Dekker, G. & Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet* **365**: 785–799.

Jido, T. A. & Yakasai, I. A. Preeclampsia: A review of the evidence. *Annals of African medicine* **12**: 75–85.

Uzan, J., Carbonnel, M., Piconne, O., Asmar, R. & Ayoubi, J.-M. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular health and risk management* **7**: 467–474. (2011).

Hladunewich M., Ananth Karumanchi S., Richard Lafayette. Pathophysiology of the Clinical Manifestations of Preeclampsia. *Clinical journal of the American Society of nephrology* **2**: 543-549. (2007).

Roberts, J. M. & Escudero, C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy hypertension* **2**: 72–83 (2012).

Mustafa, R., Ahmed, S., Gupta, A. & Venuto, R. C. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. *Journal of pregnancy*. 105918. (2012).

Aune, B., Vartun, A., Oian, P. & Sager, G. Evidence of dysfunctional beta2-adrenoceptor signal system in pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **107**: 116–121 (2000).

DENNEDY, M., HOULIHAN, D., MCMILLAN, H. & MORRISON, J.  $\beta$ - and  $\beta$ -Adrenoreceptor agonists: Human myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **187**: 641–647. (2002).

Hynes, P. G., Friel, A. M., Smith, T. J. & Morrison, J. J. Beta-adrenoceptor subtype expression in human placenta and umbilical arteries in normal and preeclamptic

pregnancies. *Hypertension in pregnancy: official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* **27**: 169–181. (2008).

Pierce LK. e Lefkowitz RJ. Classical and new roles of  $\beta$ -arrestins in the regulation of G-PROTEIN-COUPLED receptors. *Nature Reviews Neuroscience* **2**: 727-733. (2001).

Kristiansen, K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics* **103**: 21–80. (2004).

Jurado-Pueyo, M., Campos, P. M., Mayor, F. & Murga, C. GRK2-dependent desensitization downstream of G proteins. *Journal of receptor and signal transduction research* **28**: 59–70. (2008).

Evron, T., Daigle, T. L. & Caron, M. G. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends in pharmacological sciences* **33**:154–64 (2012).

Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *The Biochemical journal* **375**, 503–515. (2003).

Santulli, G., Trimarco, B. & Iaccarino, G. G-protein-coupled receptor kinase 2 and hypertension : molecular insights and pathophysiological mechanisms. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension* **20**: 5–12 (2013).

Jaber M., Koch WJ., Rockman H., Smith B., Bond RA., Sulik KK., Ross J Jr., Lefkowitz RJ., Caron MG. e Giros B. Essential role of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93(23)**:12974-12979. (1996).

Pitcher, J. A., Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. *Annual review of biochemistry* **67**, 653–92. (1998).

Gros R., Benovic JL., Tan CM. e Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *The journal of clinical investigation* **99(9)**: 2087–2093. (1997).

Iaccarino G., Barbato E., Cipolletta E., De Amicis V., Margulies KB., Leosco D., Trimarco B. e Koch WJ. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *European heart journal* **26(17)**: 1752-1758. (2005).

Gros, R. et al. G-Protein-Coupled Receptor Kinase Activity in Hypertension: Increased Vascular and Lymphocyte G-Protein Receptor Kinase-2 Protein Expression. *Hypertension* **35**: 38–42 (2000).

Izzo R., Cipolletta E., Ciccarelli M., Campanile A., Santulli G., Palumbo G., Vasta A., Formisano S., Trimarco B. e Iaccarino G. Enhanced GRK2 Expression and Desensitization of  $\beta$ AR Vasodilatation in Hypertensive Patients. *Clinical and Translational Science*, **1(3)**:215-220. (2008).

Gros R., Tan CM., Chorazyczewski J., Kelvin DJ., Benovic JL e Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* **65(5)**:545-551. (1999).

Sorriento, D. et al. The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17818–17823 (2008).

Iaccarino, G. et al. AKT participates in endothelial dysfunction in hypertension. *Circulation* **109**, 2587–2593 (2004).

Zhang, C., Williams, M. A., Edwards, K. L. & Austin, M. A. Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene, pre-pregnancy obesity and risk of pre-eclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* **17**, 19–28 (2005).

Rouget, C. et al. Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia. *Biology of reproduction* **74**, 209–16 (2006).

Premont R.T. et al. Protein Kinases that phosphorylate activated G-protein coupled receptor. *The FASEB journal*, (1995).

Napolitano, R. et al. GRK2 levels in umbilical arteries of pregnancies complicated by gestational hypertension and preeclampsia. *American journal of hypertension* **25**, 366–71 (2012).

## **DIAGNOSI PRENATALE DELLE ANOMALIE FETALI**

La diagnosi prenatale comprende un insieme di tecniche diagnostiche finalizzate al monitoraggio dello stato di salute del feto dal momento del concepimento al parto e per la diagnosi di malattie congenite. La diagnosi prenatale può attuarsi attraverso l'impiego di tecniche invasive per o non invasive, come l'ecografia ostetrica e la doppler velocimetria, per la valutazione della morfologia, della biometria e della funzionalità fetale.

La diagnosi prenatale invasiva è l'insieme delle procedure diagnostiche idonee a prelevare tessuti embrio-fetali o annessiali per l'esecuzione di analisi genetiche, cromosomiche e metaboliche; per la ricerca di agenti infettivi e per la valutazione di parametri ematologici fetali in alcune patologie della gravidanza.

Le tecniche attualmente utilizzate sono il prelievo dei villi coriali, l'amniocentesi e la cordocentesi; l'uso della fetoscopia è riservato solo a casi selezionati in Centri altamente specializzati.

La scelta della tecnica dipende dall'indicazione, dall'epoca di esecuzione del prelievo, dalla specifica esperienza dell'operatore e del laboratorio di riferimento e anche dalla preferenza della donna dettagliatamente informata.

A parità di condizioni è preferibile il ricorso alla metodica meno invasiva e più precoce: l'amniocentesi nel secondo trimestre è più sicura della villocentesi, ma quest'ultima è preferibile nei casi in cui è richiesta una diagnosi più precoce.

La diagnosi prenatale invasiva dovrebbe essere eseguita in Centri di documentata esperienza in quanto la sicurezza del prelievo dipende dall'esperienza dell'operatore mentre l'accuratezza del risultato da quella del laboratorio.

Fondamentale, prima dell'esecuzione di qualsiasi test invasivo, è la consulenza pre-esame effettuata da un medico con competenze in genetica.

La gravida deve essere informata:

- sull'entità del rischio genetico di cui è portatrice;
- sulle possibilità di screening, diagnosi, prognosi e trattamento dei difetti congeniti;

- sui rischi correlati alle diagnosi invasive, sui limiti diagnostici di queste e sui tempi necessari per ottenere le diagnosi;
- sulle modalità di esecuzione delle procedure diagnostiche;
- sulle possibilità di chiarimento diagnostico nei casi dubbi;
- sulle opzioni di comportamento dopo la diagnosi, in modo da dare alla donna la possibilità di decidere valutando rischi e benefici.

Nel corso della consulenza alla gravida deve essere consegnato un consenso informato scritto che dovrà essere firmato dalla stessa ed archiviato insieme alla documentazione clinica.

### *Prelievo dei villi coriali*

Il prelievo dei villi coriali si esegue generalmente tra la 11<sup>a</sup> e la 13<sup>a</sup> settimana di gestazione; prima della 10<sup>a</sup> settimana di gestazione il prelievo si associa ad un incremento del rischio di aborto e di difetti trasversali degli arti.

Le indicazioni al ricorso del prelievo dei villi coriali sono:

1. Determinazione del cariotipo fetale:
  - Età materna avanzata ( $\geq 35$  anni);
  - Genitore portatore di riarrangiamento cromosomico strutturale;
  - Genitore con aneuploidie dei cromosomi sessuali compatibili con la fertilità;
  - Precedente figlio con malattia cromosomica;
  - Test ecografico o biochimico che indichi un rischio elevato per Sindrome di Down o altra anomalia cromosomica.
2. Esame del DNA fetale.
3. Valutazione di attività enzimatiche.

Il prelievo si esegue per via transaddominale utilizzando un ago singolo di calibro 20 *gauge* e di lunghezza adeguata o (meno frequentemente) un doppio ago (calibro 20 *gauge* inserito in un ago “guida” da 18 *gauge*). L’uso di un ago di calibro maggiore è associato ad una minore probabilità di successo del prelievo e ad un maggior rischio. In alternativa il prelievo può essere eseguito per via transcervicale mediante un

catetere di polietilene con un mandrino di alluminio o una pinza da biopsia rigida, ma tale tecnica si associa ad un maggior rischio di aborto e di complicanza settiche.

Il prelievo dei villi coriali può essere eseguito in regime di *Day Hospital* e allo stato attuale non vi sono evidenze a favore dell'uso della profilassi antibiotica o di tocolitici da utilizzare di routine. Prima di procedere al prelievo è necessario eseguire un esame ecografico al fine di valutare il numero, la vitalità e la biometria dell'embrione, localizzare il *corion frondosum* e scegliere il punto più idoneo per l'inserzione dell'ago. Le procedure di prelievo devono essere eseguite sotto controllo ecografico continuo, sia per dirigere l'ago verso il *corion frondosum*, sia durante l'aspirazione del materiale. Se il materiale è insufficiente è possibile eseguire ulteriori tentativi di prelievo (con ago nuovo), ma il rischio di perdita fetale aumenta considerevolmente dopo due tentativi. Nelle donne Rh negative con test di Coombs negativo, la villocentesi può causare l'insorgenza di un'isoimmunizzazione Rh, per tanto è indicato effettuare la profilassi mediante iniezione di immunoglobuline anti-D. Per quanto concerne il rischio infettivologico, nelle donne con epatite B o C il prelievo dei villi coriali può essere eseguito perché non vi sono, in letteratura, evidenze di trasmissione verticale del virus dopo la procedura, anche se i dati non sono esaustivi in quanto si riferiscono a piccole casistiche. Anche per le donne HIV positive non vi sono evidenze che la villocentesi aumenti il rischio di trasmissione verticale, soprattutto se il prelievo è praticato durante la somministrazione di terapia antiretrovirale alla madre e la carica virale materna è molto bassa.

Il prelievo dei villi coriali presenta un tasso di successo del 98% dei casi al primo tentativo e del 99,8% con due tentativi; nella quasi totalità dei casi (97%) si riesce ad ottenere una quantità congrua di villi coriali (> 10 mg). In circa lo 0,5-1% dei casi si può verificare un fallimento dell'esame citogenetico, spesso a causa della scarsità del materiale prelevato (utile in questi casi la ripetizione dell'esame). Falsi positivi sono stati descritti nell'1% dei casi circa, quasi sempre per la presenza di mosaicismi placentari (90%) e raramente per aneuploidie non a mosaico. In questi casi può essere necessario ripetere l'esame (amniocentesi o cordocentesi). Falsi negativi degli esami



citogenetici sono rarissimi: 1 su 3.000 utilizzando la sola tecnica diretta e 1 su 20.000 utilizzando la tecnica diretta in associazione a quella colturale. L'errore diagnostico nelle analisi delle malattie metaboliche e del DNA è in funzione della patologia ricercata, ma è comunque estremamente raro.

Il prelievo dei villi coriali comporta un rischio abortivo aggiuntivo dell'1%. Esso è legato a diversi fattori: direttamente all'età materna, al numero dei tentativi di prelievo, all'assetto citogenetico della placenta (mosaicismo); inversamente all'epoca di gravidanza in cui si esegue la procedura e soprattutto all'esperienza dell'operatore. Quando eseguito prima della 10<sup>a</sup> settimana di gravidanza, il prelievo dei villi coriali si associa ad aumentato rischio di difetti trasversali degli arti fetali.

Altre complicanze descritte sono le perdite ematiche vaginali e le infezioni; esse sono piuttosto rare e non sembrano influenzare l'outcome fetale.

In letteratura sono presenti meta-analisi e trials randomizzati che confrontano il rischio d'aborto dopo villocentesi rispetto a quello dopo amniocentesi. Tali studi hanno evidenziato un tasso d'aborto più alto nelle gravide che si sottoponevano a villocentesi rispetto a quelle che ricorrevano ad amniocentesi nel secondo e terzo trimestre di gravidanza. In ogni caso il solo studio randomizzato che confronta il rischio d'aborto tra villocentesi eseguita per via transaddominale ed amniocentesi nel secondo e terzo trimestre riporta valori simili in termini di "pregnancy loss" nei due gruppi (6,3% rispetto al 7%).

### *Amniocentesi*

L'amniocentesi è il test invasivo più comune e può essere praticato a partire dalla 15<sup>a</sup> settimana di amenorrea. Le linee guida raccomandano di eseguire l'amniocentesi tra la 16<sup>a</sup> e la 18<sup>a</sup> settimana di gestazione, in quanto un prelievo eseguito in epoca più precoce si associa a maggiori difficoltà di esecuzione, ad un maggior rischio abortivo, a perdita di liquido amniotico, al piede torto equino-varo e al fallimento della coltura cellulare.

Le indicazioni al ricorso all'amniocentesi sono:

1. Determinazione del cariotipo fetale:

- Età materna avanzata ( $\geq 35$  anni);
  - Genitore portatore di riarrangiamento cromosomico strutturale;
  - Genitore con aneuploidie dei cromosomi sessuali compatibili con la fertilità;
  - Precedente figlio con malattia cromosomica;
  - Malformazioni fetali rilevate all'esame ecografico;
  - Test biochimico (duo test, triplo test) che indichi un rischio elevato per Sindrome di Down o altra anomalia cromosomica.
2. Ricerca di agenti infettivi virali o protozoari nel liquido amniotico.
  3. Esame del DNA fetale.
  4. Determinazione della concentrazione dell'*alfa*-fetoproteina o di altri metaboliti fetali nel liquido amniotico.

Il prelievo si esegue per via transaddominale utilizzando un ago singolo di calibro 20-22 *gauge* e di lunghezza adeguata. L'uso di un ago di calibro maggiore è associato ad un maggior rischio di perdita fetale. L'amniocentesi può essere eseguita in regime di *Day Hospital* e allo stato attuale non vi sono evidenze a favore dell'uso della profilassi antibiotica o di tocolitici da utilizzare di routine. Prima di procedere al prelievo è necessario eseguire un esame ecografico al fine di stabilire l'epoca gestazionale mediante valutazione dei parametri biometrici fetali. Inoltre l'ecografia eseguita prima del prelievo di liquido amniotico consente di stabilire il numero, la vitalità e la posizione del feto, nonché di localizzare la placenta e scegliere il punto più idoneo per l'inserzione dell'ago. E' preferibile evitare la puntura transplacentare e se questa è inevitabile, in quanto consente di accedere ad una tasca di liquido amniotico più idonea, va evitato di inserire l'ago in vicinanza dell'inserzione cordone ombelicale e dove la placenta è più sottile. Il prelievo va eseguito sotto continuo controllo ecografico e andrebbe prelevata una quantità di liquido amniotico corrispondente in millilitri alle settimane di gestazione e comunque non eccedente i 20 ml.

Nelle donne Rh negative con test di Coombs negativo, è indicata la profilassi mediante iniezione d'immunoglobuline anti-D. Per quanto concerne il rischio infettivologico, nelle donne con epatite B o C l'amniocentesi può essere eseguita perché non vi sono, in letteratura, evidenze di trasmissione verticale del virus dopo la procedura, anche se i dati non sono esaustivi in quanto si riferiscono a piccole casistiche. Anche per le donne HIV positive non vi sono evidenze che l'amniocentesi aumenti il rischio di trasmissione verticale, soprattutto se il prelievo viene praticato durante la somministrazione di terapia antiretrovirale alla madre e la carica virale materna è molto bassa.

Nel 98% dei casi al primo tentativo si riesce ad ottenere una quantità adeguata di liquido amniotico; nei Centri di maggiore esperienza il tasso di successo raggiunge il 99,8%. Nel 98% dei casi il liquido prelevato è perfettamente limpido, mentre nei rimanenti casi può essere presente sangue (0,4%) o pigmento bruno di origine ematica (<2%). Il fallimento dell'esame citogenetico si verifica nello 0,2% dei casi a causa della presenza di sangue nel liquido amniotico o per altri motivi e richiede la ripetizione dell'esame. In caso di mosaicismo cellulare che si verifica nello 0,2-0,5% dei casi può essere opportuno procedere ad un nuovo prelievo (cordocentesi) per il chiarimento diagnostico. I falsi negativi sono molto rari e legati all'esperienza del laboratorio (1 su 5.000); essi sono dovuti alla presenza di mosaicismi non riconosciuti o di riarrangiamenti cromosomici di piccola entità o a contaminazione da parte di cellule materne.

L'amniocentesi comporta un rischio aggiuntivo di perdita fetale dell'1%. Tale rischio è stato stabilito in base ad un trial randomizzato eseguito in Danimarca nel 1986, in cui era stato osservato che l'aborto si manifestava nelle gravide che si sottoponevano ad amniocentesi con una frequenza dell'1% maggiore rispetto a quella osservata nelle gravide che non praticavano l'amniocentesi. Studi di coorte più recenti hanno ottenuto un tasso di perdite della gravidanza significativamente più basso in seguito ad amniocentesi, ma tale risultato sembra essere legato oltre che alla procedura anche all'intervallo di tempo considerato nel follow-up. Inoltre il tasso di aborto dopo

amniocentesi sembra essere inferiore all'1% quando vengono considerati i singoli operatori.

Il rischio abortivo dopo amniocentesi aumenta sensibilmente in presenza di fattori di rischio quali:

- precedente abortività (fino al 7%);
- presenza di emorragie genitali nel corso della gravidanza (fino al 6%);
- presenza di sangue nel liquido amniotico (fino al 15%);
- valori di *alfa*-fetoproteina sierica > 2 MoM (fino al 20%).

E' stato descritto anche un rischio aumentato dopo prelievo di liquido amniotico di rottura prematura delle membrane amniocoriali (circa l'1%) e di parto pretermine (rischio non quantificato). Il rischio di lesioni fetali provocate dall'ago è invece trascurabile se il prelievo è eseguito sotto continuo controllo ecografico.

### *Cordocentesi*

La cordocentesi può essere eseguita a partire dalla 18<sup>a</sup> settimana di gestazione al fine di prelevare un campione adeguato di sangue fetale per le indagini diagnostiche richieste o per effettuare terapie intravascolari fetali.

Le indicazioni a tale procedura sono rappresentate da:

1. Studio di parametri ematologici del feto.
2. Determinazione rapida del cariotipo fetale.
3. Terapie mediche fetali.
4. Studio del DNA fetale.
5. Ricerca di agenti infettivi.

La vena ombelicale nei pressi dell'inserzione placentare rappresenta la sede di elezione per effettuare un prelievo di sangue fetale a scopo diagnostico. Quando non è possibile a causa della posizione fetale e/o della placenta, il prelievo può essere effettuato da un'ansa libera del cordone ombelicale. Il campione di sangue prelevato può essere immediatamente analizzato con un *Coulter Counter* per confermare l'origine fetale; in aggiunta può essere praticato il test di Kleinhauer-Betke per rilevare l'eventuale presenza di contaminazione da parte di sangue materno. Nelle

donne con fattore Rh negativo è opportuno praticare la profilassi con immunoglobuline anti-D, in quanto l'esecuzione della cordocentesi è associata ad un numero rilevante di casi di emorragia feto-materna.

Il successo del prelievo con singolo ago dall'inserzione placentare della vena ombelicale è stimato essere del 97%; valori analoghi sono stati ottenuti anche con la tecnica del prelievo da ansa libera di cordone. Quest'ultima tecnica presenta però tempi di esecuzione più lunghi nonché un numero di tentativi di prelievo maggiori, mentre si associa ad un minor rischio di contaminazione da parte di sangue materno o liquido amniotico (2% vs 4%).

La cordocentesi è una metodica particolarmente indaginosa e l'esperienza dell'operatore correla direttamente con il rischio di perdita fetale. L'uso di tale procedura andrebbe pertanto riservata solo ad operatori molto esperti in Centri di riferimento.

I rischi e le complicanze legate a tale metodica sono:

- perdita fetale più alta rispetto a quella osservata dopo amniocentesi e/o villocentesi (2% circa entro due settimane dal prelievo) in gestanti a basso rischio. La presenza di aneuploidie cromosomiche, di anomalie strutturali, di ritardo di crescita intrauterino, l'oligoidramnios, la presenza di idrope fetale, la sede del prelievo, la bradicardia fetale e/o il sanguinamento dalla sede del prelievo, e la ridotta esperienza dell'operatore sono i fattori più comunemente associati ad un aumentato rischio di perdita fetale (fino al 35% dei casi);
- sanguinamento dalla sede di puntura del cordone ombelicale correlato alle dimensioni dell'ago. E' la complicanza più frequente dopo cordocentesi e si associa a maggiore incidenza di perdita fetale;
- bradicardia fetale, definita come frequenza cardiaca inferiore a 100 battiti per minuto della durata di almeno 60 secondi. Frequente dopo cordocentesi, si associa a maggiore incidenza di perdita fetale. Fattori di rischio per la bradicardia fetale sono: la puntura dell'arteria invece della vena e la presenza

di grave ritardo di crescita intrauterino fetale (circonferenza addominale < 2,5° percentile o peso stimato < 10° percentile).

Negli ultimi dieci anni la valutazione ecografica è andata incontro ad una notevole trasformazione che ha consentito di accertare non solo se una paziente è gravida, ma anche se sia presente un'anomalia fetale. I recenti progressi delle tecniche ecografiche come l'uso di sonde transvaginali ad alta frequenza, l'imaging tridimensionale e quadridimensionale e l'elaborazione digitale delle immagini, hanno accresciuto l'interesse verso l'uso dell'ecografia nella paziente ostetrica. Tutto ciò ha reso possibile identificare anomalie sempre più piccole, grazie anche ai progressi ottenuti nella conoscenza dell'anatomia e della fisiopatologia fetali.

Gravi malformazioni congenite sono diagnosticate nel 4-8% dei bambini durante il primo anno di vita. Le malformazioni congenite sono la categoria etiologica responsabile della maggior parte della mortalità infantile negli Stati Uniti (oltre il 21% di tutti i decessi). Si è stimato che negli Stati Uniti nascano ogni anno 100.000-150.000 bambini con gravi malformazioni congenite e che circa 8.000 di essi muoiano prima del concepimento del primo anno di vita. I bambini con malformazioni congenite costituiscono circa il 30% dei casi di ricovero pediatrico, con un costo totale sanitario stimato in oltre 1,4 miliardi di dollari l'anno.

Il momento della gravidanza più opportuno per eseguire un'ecografia completa è un argomento ancora molto controverso. Molti hanno proposto di eseguirla poco prima dell'amniocentesi (14<sup>a</sup>-16<sup>a</sup> settimana) o anche prima, al momento della valutazione della translucenza nucale. Sebbene sia vero che è possibile identificare in corso di esame ecografico di screening del 1° trimestre alcune anomalie morfologiche utilizzando in particolare una sonda transvaginale ad alta frequenza, alcune anomalie del viso, del cuore e dello scheletro non sono rilevabili in epoche gestazionali precoci. Parimenti, determinate fasi dello sviluppo embrionale, come lo sviluppo del verme cerebellare e del corpo calloso, diventano complete solo alla metà o al termine del 2° trimestre. Per tanto ad oggi l'epoca gestazionale più appropriata per lo studio

delle malformazioni fetali rimane il 2° trimestre di gravidanza, poiché in tale periodo le dimensioni del feto consentono di escludere la maggior parte delle anomalie fetali. L'ultima classificazione degli esami ecografici in corso di gravidanza redatta dall'American Institute of ultrasound in Medicine (AIUM), dall'American College of Radiology (ACR) e dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) raggruppa tali indagini in quattro categorie principali:

- 1) esame ecografico del 1° trimestre;
- 2) esame ecografico standard del 2° trimestre o 3° trimestre;
- 3) esame limitato;
- 4) esami specialistici.

Tale classificazione ha aperto un importante dibattito su cosa s'intendeva per ecografia standard del 2° e 3° trimestre (definita anche come *esame di livello 1*) e cosa s'intendeva per ecografia specialistica o *esame di livello 2*. Questi termini furono introdotti alla fine degli anni '70 per consentire un'ulteriore valutazione dei casi in cui erano stati rilevati alti livelli di *alfa*-fetoproteina (AFP) nei test per evidenziare difetti del tubo neurale. Le ecografie di livello 1 miravano, per lo più, a rilevare problemi ostetrici che portavano a elevati livelli di AFP sierica materna (gemellarità, datazione erranea della gravidanza, morte del feto in utero); le ecografie di livello 2 erano eseguite soprattutto per rilevare le anomalie fetali (difetti aperti del tubo neurale, difetti della parete addominale). Se è vero che chi esegue un esame di livello 2 è abilissimo nell'individuare i casi di anomalie congenite, non significa che chi esegue un esame di livello 1 non sia competente. Come indicato nel 2003 nelle linee guida AIUM/ACR/ACOG, l'esame di livello 1 richiede un elevato grado di competenza ed è a tutti gli effetti l'esame ecografico ostetrico standard per il 2° e 3° trimestre, mentre l'ecografia di livello 2 è un'indagine anatomica dettagliata che viene eseguita qualora si sospetti un'anomalia sulla base dell'anamnesi, di alterazioni biochimiche oppure dopo un esame standard di livello 1.

In Italia le linee guida della Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica (SIEOG) pubblicate nel 2010 individua per una gravida "a basso rischio" tre esami

ecografici fondamentali: l'ecografia del primo trimestre (entro le 13 settimane e 6 giorni di età gestazionale), l'ecografia del secondo trimestre (da 14 settimane e 0 giorni a 26 settimane e 0 giorni) e l'ecografia ostetrica del terzo trimestre.

*Finalità dell'esame ecografico del primo trimestre:*

- visualizzazione dell'impianto in sede uterina della camera gestazionale ed il loro numero;
- visualizzazione della presenza dell'embrione/feto, del loro numero e dell'attività cardiaca;
- datazione della gravidanza;
- misurazione della translucenza nucale, da effettuare esclusivamente a 11-13 settimane + 6 giorni di gestazione (CRL fetale compreso tra 45 e 84 mm).

*Finalità dell'esame ecografico del secondo trimestre:*

- determinazione del numero di feti;
- datazione della gravidanza;
- valutazione dell'anatomia fetale, tra le 19 e le 21 settimane di età gestazionale.

*Finalità dell'esame ecografico del terzo trimestre:*

- valutazione della crescita fetale;
- valutazione della quantità di liquido amniotico e dell'inserzione placentare.

La morfogenesi fetale è un evento evolutivo, che non può essere colto in maniera omnicomprensiva con un unico esame ecografico. Una malformazione fetale può non essere riconosciuta perché non è presente al momento dell'osservazione ecografica, perché non da segni ecografici o perché i segni ecografici compaiono tardivamente. I dati presenti in letteratura indicano che l'utilizzo degli ultrasuoni nella diagnosi di malformazioni fetali ha una sensibilità media che varia dal 30% al 61% ed una specificità superiore al 99%. La sensibilità varia in rapporto all'organo/apparato considerato ed è influenzata dall'epoca gestazionale, dall'esperienza dell'operatore, dall'adeguatezza dell'apparecchiatura utilizzata e da condizioni che riducono la visualizzazione fetale (obesità, posizione fetale, polidramnios, oligoamnios, gravidanza multipla). Quando l'esame ecografico è eseguito in una gravida con un



rischio aumentato per una determinata patologia, la sensibilità dell'ecografia aumenta (range compreso tra 73% e 99%).

Inoltre si può sospettare fortemente un'anomalia che però non può essere dimostrabile con certezza o può non rientrare in una categoria ben precisa. In tal caso sarà utile eseguire un'ecografia di controllo e soprattutto sarà utile richiedere una consulenza genetica. La consulenza genetica vede il coinvolgimento di diverse figure professionali tra cui il genetista clinico, il pediatra e i vari specialisti di quella patologia considerata ed ha come scopo quello di fornire alla coppia gli strumenti necessari per affrontare le conseguenze legate alla problematica fetale.

## ***a) Screening prenatale e counseling per malattie genetiche***

### **OBIETTIVI**

Descrivere l'esperienza del Centro di Diagnosi Prenatale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e discutere il ruolo dello screening per la beta-talassemia, la fibrosi cistica e le malattie genetiche "rare", sottolineando l'importanza etica e socio-economica del counseling genetico e dello screening prenatale.

## **MATERIALI E METODI**

Abbiamo analizzato retrospettivamente le indicazioni alla diagnosi prenatale invasiva di tutte le coppie afferite presso il Centro di Diagnosi Prenatale del Dipartimento ad Attività Integrate di Ginecologia Ostetricia e Urologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" diretto dal Prof. Pasquale Martinelli da gennaio 1993 a marzo 2013.

Il nostro campione è stato diviso in tre gruppi: coppie a rischio per beta-talassemia, coppie a rischio per fibrosi cistica e coppie a rischio per altra malattia genetica.

Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test Chi-quadro per le variabili categoriche e il test ANOVA per le variabili continue. Le indicazioni al test di screening prenatale sono state ottenute retrospettivamente, mediante accesso alle cartelle cliniche e/o ai database. Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato SPSS18.0 (INC., Chicago IL.).

## **RISULTATI**

Da gennaio 1993 a marzo 2013 abbiamo eseguito 1269 diagnosi prenatali per malattie genetiche. In particolare, abbiamo eseguito 190 amniocentesi (14.9%) e 1079 prelievi dei villi coriali (85,1%). 528 coppie (41.6%) sono afferite al nostro centro per eseguire diagnosi prenatale di beta-talassemia, 192 coppie (15.1%) per eseguire la diagnosi prenatale di fibrosi cistica e 549 coppie (43.3%) per sottoporsi a diagnosi prenatale invasiva di altre malattie genetiche “rare”. Le caratteristiche cliniche ed anamnestiche di ciascun gruppo sono riportate nella tabella 1.

Il gruppo delle malattie genetiche “rare” include più di 70 malattie differenti; la frequenza delle singole malattie genetiche stratificata in base alla prevalenza è riportata nella tabella 2.

69 delle 549 diagnosi prenatali invasive per malattie genetiche “rare” (12.6%) sono state eseguite per la ricerca di disordini autosomici dominanti, 237 (43.2%) per disordini autosomici recessivi e 243 (43.2%) per malattie recessiva X-linked.

Le indicazioni per lo screening prenatale sono riportate nella tabella 3.

Per 77 delle 528 coppie portatrici di trait-talassemico (14.6%) i dati sono stati persi; mentre tutti i dati delle coppie a rischio per fibrosi cistica e di quelle a rischio per le altre malattie genetiche “rare” sono stati recuperati.

*Tabella 1.* Caratteristiche cliniche ed anamnestiche delle donne a rischio di avere un bambino affetto da fibrosi cistica, beta-talassemia e altre malattie genetiche rare.

Variabile	FC N=192 (15,1%)	BT N=528 (41,6%)	Malattie genetiche rare N=549 (43,3%)
Età* anni (media $\pm$ SD)	31,4 $\pm$ 0,4	29,2 $\pm$ 0,2	30,8 $\pm$ 0,2
Amniocentesi* N= (%)	17 (8,9%)	45 (8,5%)	148 (26,1%)
Età gestazionale settimane (media $\pm$ DS)	18,6 $\pm$ 3,9	17,7 $\pm$ 2,2	17,3 $\pm$ 2,1
CVS* N=(%)	175 (91,1%)	483 (91,5%)	421 (73,9%)
Età gestazionale settimane (media $\pm$ SD)	11,5 $\pm$ 1,2	11,5 $\pm$ 1,4	11,8 $\pm$ 1,3
> 1 diagnosi prenatale presso il nostro centro* N (%)	72 (37,5%)	292 (58,3%)	232 (40,8%)
Gravidanze gemellari N(%)	2 (1,0%)	8 (1,5%)	3 (0,5%)
Numero gravidanze* (madiana)	3	2	2

\*  $p < 0,001$  (ANNOVA Test)

*Tabella 2.* Numero di diagnosi prenatali per malattie genetiche rare stratificate per la prevalenza (numero di casi).

> 1:50.000 N= 372 (67,8%)	1:50.000 – 1: 100.000 N=99 (18,0%)	< 1:100.000 N= 78 (14,2%)
<p>Acondroplasia (11) Alpha-thalassemia (6) Angelman Syndrome (6) Autosomal dominant deafness 3A (5) Centronuclear myopathy (3) Congenital 21-OH deficiency (12) Congenital Disorders of Glycosylation 1a (1) Facioscapulohumeral muscular dystrophy 1_(1) Familial Adenomatous Polyposis I (1) Fragile X Syndrome (40) Glycine encephalopathy (3) Haemophilia A and B (63) Huntington's Disease (11) Myotonic Dystrophy Type 1 (16) Muscular Dystrophy (99) Neuromuscular ceroid lipofuscinosis (1) Ornithine Transcarbamylase Deficiency (4) Propionic Acidemia (2) Phenylketonuria (10) Pyruvate Kinase Deficiency (1) Rett Syndrome (3) Spinal Muscular Atrophy (57) Spinocerebellar Ataxia 3 (4) Tuberous Sclerosis (9) Von Hippel-Lindau Disease (1) X-Linked hydrocephalus (2)</p>	<p>Argininosuccinic Aciduria (5) Carbonic Anhydrase II deficiency (2) Choroideremia (2) Friedreich's Ataxia (1) Galactosemia (3) Glycogen Storage Disease Type Ib, II and III (13) Holt-Oram Syndrome (2) Krabbe Leukodystrophy (8) Lymphocytosis (1) MEN 1 e 2 (3) Methylmalonic Aciduria (14) Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB (17) Papillon-Leage-Psaume Syndrome (1) Propionic Acidemia (2)</p>	<p>APECED Syndrome (1) Bruton's disease (2) Canavan Disease (5) Carbamoyl phosphate synthetase deficiency (3) Pyruvate Carboxylase Deficiency (1) Ethylmalonic encephalopathy (2) Fanconi Anemia (6) Glycogen Storage Disease Type IV (2) Gangliosidosis Type 1 and 2 (7) HHH Syndrome (1) Lesch-Nyhan syndrome (4) Lysinuric Protein Intolerance (1) Maple syrup urine disease type II (1) Metatropic Dysplasia (1) Molybdenum cofactor deficiency (1)  Mucopolysaccharidosis Type II (19) Niemann-Pick Disease (11) Nonketonic hyperglycinemia (6) Progeria (1) Schimke immuno-osseous dysplasia (1) Wiskott Aldrich Syndrome (2)</p>

Tabella 3. Indicazioni allo screening dei genitori.

Indicazione	FC N=182	BT N=451	Malattie genetiche rare N=549
Bambino affetto N (%)	155 (80,7%)	51 (11,3%)	190 (34,6%)
Screening mirato N(%)	28 (14,6%)	41 (9,1%)	251 (45,7%)
Screening prenatale N (%)	-	153 (33,4%)	-
Screening preconcezionale N(%)	5 (2,6%)	206 (45,7%)	-
Anomalie fetali intestinali all'USG N(%)	4 (2,2%)	-	-
Parente affetto N (%)	-	-	108 (19,8%)

## DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo descritto la nostra esperienza nello screening delle malattie genetiche nelle gravide afferite presso il Centro di Diagnosi Prenatale del Dipartimento ad Attività Integrate di Ginecologia Ostetricia e Urologia dell'Università degli studi di Napoli "Federico II" per sottoporsi a diagnosi prenatale invasiva. Per meglio comprendere il ruolo dello screening prenatale, abbiamo deciso di dividere il nostro campione in tre gruppi: coppie a rischio per beta-talassemia, coppie a rischio per fibrosi cistica e coppie a rischio per altre malattie genetiche "rare". La beta-talassemia e la fibrosi cistica rappresentano le malattie genetiche più frequenti nella nostra area geografica; di conseguenza le coppie spesso praticano lo screening per tali patologie già in epoca pre-concezionale. Al contrario, non è possibile effettuare uno screening su larga scala delle malattie genetiche "rare" a causa della bassa incidenza delle stesse. Nel nostro centro abbiamo riscontrato, in accordo a quanto riportato in letteratura, una crescente domanda per il counseling genetico e per la diagnosi prenatale di malattie genetiche "rare".

Come evidenziato nella *tabella 3*, ci sono ancora coppie che scoprono di essere portatrici di beta-talassemia in seguito allo screening effettuato dopo la nascita di un figlio affetto. Chiaramente la percentuale di tali coppie è molto bassa in quanto nella nostra regione, essendo la beta-talassemia endemica, è largamente praticato durante la gravidanza lo screening di tale patologia mediante la misurazione di parametri ematologici, la valutazione del deficit di ferro e lo studio dell'elettroforesi dell'emoglobina. Nonostante lo screening per la beta-talassemia vada offerto a tutte le donne in età fertile, ad oggi la percentuale di donne che ricorrono allo screening in corso di gravidanza è ancora alta.

Al contrario di quanto osservato per la beta-talassemia, lo screening per la fibrosi cistica viene effettuato generalmente dopo la nascita di un figlio affetto o durante programmi di screening mirati e solo una piccola percentuale di coppie effettuano lo screening in epoca pre-concezionale. La principale indicazione allo screening prenatale della fibrosi cistica è rappresentata dal riscontro durante l'ecografia fetale di



anomalie intestinali, quali l'iperecogenicità intestinale e la dilatazione delle anse intestinali che si associano ad un aumentato rischio del 3% del feto di essere affetto da fibrosi cistica. Un test di screening su larga scala consente di identificare gli individui a rischio per una determinata malattia genetica attraverso un meccanismo di mappatura sistematica delle famiglie. Per questo motivo, nella nostra casistica le coppie a rischio per fibrosi cistica richiedevano una diagnosi prenatale invasiva più tardi rispetto alle coppie a rischio per beta-talassemia.

Nonostante fin dal 1997 il National Institute of Health raccomanda di offrire lo screening per la fibrosi cistica a tutte le coppie durante la gravidanza o in fase pre-concezionale, vi sono molte difficoltà legate all'introduzione del test di screening per la fibrosi cistica su larga scala. Ad oggi non è possibile identificare gli individui portatori di mutazioni per fibrosi cistica mediante strumenti clinici o biochimici, ma solo attraverso l'utilizzo di test genetici che comportano un elevato costo per la coppia. Inoltre l'ampia variabilità di mutazioni del gene CFTR per la fibrosi cistica rende difficile l'implementazione dello screening. Inoltre, dalla scoperta della prima mutazione del gene CFTR (F805del) nel 1989, sono state individuate più di 1900 mutazioni a carico di tale gene. L'American College of Medical Genetic propone un pannello di sole 25 mutazioni per lo screening della fibrosi cistica. Questo pannello di mutazioni è particolarmente adatto per i discendenti dagli ebrei Ashkenazi (97%) mentre è meno sensibile per la popolazione del sud Europa (70%). Per tale motivo, nel test di screening per fibrosi cistica, alle mutazioni più frequentemente associate andrebbe aggiunto un pannello per ricercare le mutazioni specifiche per quella determinata popolazione, ossia quelle mutazioni la cui frequenza è di circa l'1% in quella determinata area geografica. Dal 2001 nel sud Italia vengono incluse nel pannello classico 5 mutazioni specifiche per la nostra area.

Dal momento che i test di screening ricercano solo le mutazioni più frequenti, un risultato negativo al test non esclude del tutto che l'individuo sia portatore di una mutazione in eterozigosi per la fibrosi cistica. Inoltre diversi studi hanno dimostrato che le persone spesso dimenticano i risultati dello screening per la fibrosi cistica e, in

particolare, sottostimano il rischio residuo. Il counseling genetico alle coppie a rischio per fibrosi cistica è quindi particolarmente difficile, anche perché molte delle mutazioni del gene CFTR non hanno allo stato attuale una correlazione con uno specifico quadro clinico. Nel corso del counseling genetico andrebbe poi discusso con la coppia il differente tasso di sopravvivenza degli individui affetti da tale disordine genetico. Solo 30 anni fa, un paziente affetto da fibrosi cistica aveva una bassa aspettativa di vita, non riuscendo a raggiungere l'età adulta; oggi invece molti individui affetti vivono fino a 50 e 60 anni.

Al contrario di quanto osservato nelle coppie a rischio per beta-talassemia o fibrosi cistica, lo studio molecolare delle coppie ad alto rischio per malattie genetiche “rare” è stato effettuato sempre dopo la nascita di un figlio affetto o in caso di anamnesi familiare positiva per quella determinata malattia. Nel gruppo delle malattie genetiche “rare” sono state incluse più di 70 patologie (tabella 2); in particolare, 78 (14,2%) procedure invasive sono state praticate per malattie genetiche con una prevalenza inferiore a 1 su 100.000.

La richiesta di screening prenatale per malattie genetiche “rare” è in rapida crescita, e ciò da luogo ad importanti riflessioni sull'eticità di tale problema. L'espressività variabile, la differenza genotipo-fenotipo, l'epoca d'insorgenza (precoce o tardiva) di una malattia sono problemi che spesso rendono estremamente difficile il counseling genetico e l'esecuzione della diagnosi prenatale. Per tanto lo screening e la diagnosi prenatali di una malattia genetica vanno offerti solo dopo un adeguato counseling. La coppia deve essere informata non solo sulla metodica con cui è eseguito il test prenatale invasivo, ma anche che spesso il test diagnostico non consente di conoscere l'età d'insorgenza, il decorso clinico nonché il grado di disabilità di quella specifica malattia. E' compito del genetista e del ginecologo spiegare in maniera esaustiva il tipo di malattia, i segni clinici, l'epoca d'insorgenza, l'outcome e le varie opzioni terapeutiche durante il counseling multidisciplinare.

Ad esempio, non vi sono molte indicazioni alla diagnosi prenatale della fenilchetonuria perché la dieta influenza positivamente l'espressione fenotipica di tale

patologia autosomica recessiva. Di fatto, una dieta povera di proteine e l'assunzione controllata di fenilalanina garantiscono un normale sviluppo neurologico dei pazienti affetti. Inoltre lo screening neonatale della fenilchetonuria è obbligatorio, consentendo di porre diagnosi entro 48-72 ore dalla nascita.

Nei casi delle malattie autosomiche dominanti, quando la madre è affetta, la diagnosi prenatale gioca un ruolo cruciale nel corretto management della gravidanza. Ad esempio, per la MEN 2A, è stato recentemente scoperto che la diagnosi prenatale ed un corretto management possono migliorare significativamente l'outcome, riducendo la mortalità materna e fetale. Le mutazioni dell'oncogene RET sono associate a differenti livelli di rischio di sviluppare il carcinoma midollare della tiroide e il feocromocitoma. Di conseguenza, il counseling genetico e la diagnosi prenatale sono dirimenti per rassicurare i genitori sul rischio a lungo termine del loro bambino di sviluppare tumori.

Un punto cruciale nel counseling genetico è il possibile rischio residuo dopo un test molecolare. Ad esempio, in una coppia a rischio per Atrofia Muscolo Spinale, ricercata nella nostra casistica in 57 casi (10,4%), la sensibilità del test molecolare è del 93-95%. Di conseguenza, il test molecolare non sempre è in grado di identificare la malattia sia perché i genitori possono essere portatori di una piccola mutazione rara sia perché può verificarsi una mutazione *de novo*.

La possibilità di mutazioni sconosciute e di mutazioni *de novo* fanno sì che il genetista debba sempre sottolineare il possibile rischio residuo dopo un test genetico molecolare.

Importanti problemi etici sono legati anche all'insorgenza in età adulta di alcune patologie, come nel caso della Malattia di Huntington. Quest'ultima è un disordine neurodegenerativo a trasmissione autosomica dominante caratterizzato da deficit motori, deficit cognitivi, sintomi psichiatrici legati all'inesorabile declino e morte, che possono insorgere ad ogni età. La Malattia di Huntington ha un'incidenza di 1 su 25.000 individui. Tra tutte le coppie afferite al nostro centro per la diagnosi prenatale di tale disordine genetico, vi è stato un solo genitore affetto che aveva scoperto la sua

malattia in seguito a test di screening praticato per anamnesi familiare positiva. Il test è disponibile dal 1993, quando è stato scoperto il gene responsabile di tale disordine neurodegenerativo, e consente di porre la diagnosi, in caso di sintomatologia suggestiva per Malattia di Huntington, o di informare una persona che potrebbe sviluppare la malattia nel corso della vita. Il test non consente di fornire informazioni circa la severità della malattia o l'età d'insorgenza della stessa. I ginecologi insieme ai genetisti dovrebbero spiegare, durante il counseling, la variabilità fenotipica e l'interazione tra età d'insorgenza, sintomatologia e penetranza. Nella Malattia di Huntington, così come nelle altre malattie ad insorgenza nell'età adulta, il clinico deve prendere in considerazione durante lo svolgimento del counseling, la possibilità che i genitori dichiarino la propria volontà di portare avanti la gravidanza, nonostante il risultato del test prenatale risulti positivo. Ciò comporta altri problemi etici. Infatti, da un lato prevale il diritto dei genitori di conoscere l'assetto genetico del loro futuro nascituro circa quella determinata patologia ad insorgenza tardiva, dall'altro lato potrebbe prevalere il diritto del futuro bambino di non conoscere la diagnosi genetica, o di decidere lui stesso quando effettuare la diagnosi di quella determinata patologia. Tali problematiche sono ancor più importanti in quei casi in cui non vi sono possibilità di trattamento per quella data malattia.

## CONCLUSIONI

Negli ultimi anni si è osservato in tutto il mondo un incremento nella domanda per lo screening e la diagnosi delle malattie genetiche in epoca prenatale.

Grazie ai successi ottenuti in biologia molecolare e genetica medica è oggi possibile effettuare la diagnosi prenatale delle malattie genetiche “rare” di cui si conosce il disordine genetico.

Il nostro Centro di Diagnosi Prenatale, in collaborazione con il GEINGE di Napoli, è parte di un network internazionale per la diagnosi delle malattie di cui si conosce la mutazione.

La percentuale di gravide “a rischio” per malattie genetiche che afferiscono presso il nostro centro aumenta sempre di più e con lei la domanda per la diagnosi di malattie genetiche rare. Di conseguenza si è osservato un incremento nel numero di diagnosi prenatali invasive nonché un incremento del tipo di malattia per cui è possibile praticare la diagnosi prenatale.

Per questo motivo è fondamentale eseguire un’accurata anamnesi e un adeguato counseling all’inizio della gravidanza al fine di identificare le gravide a rischio di avere un bambino affetto da una malattia genetica. Durante il counseling, la paziente deve essere informata, in maniera chiara ed esaustiva, sulle possibilità diagnostiche e le opzioni terapeutiche ed “aiutata” nella decisione al fine di migliorare l’outcome materno-fetale in considerazione anche dei problemi di natura etica. La rilevanza della malattia richiede un team multidisciplinare che vede la collaborazione di ginecologo, genetista medico, biologo molecolare e psicologo.

## BIBLIOGRAFIA

Rare diseases act of 2002. PUBLIC LAW 107–280—Nov 6, 2002.

Alfirevic Z, et al.: Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane Database Syst. Rev., 2003; (3): CD003252

Smidt-Jensen S et al.: Randomized comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling: Lancet 1992; 430: 1237-1244

Carlin AJ, Alfirevic Z.: Techniques for chorionic villus sampling and amniocentesis: a survey of practice in specialist UK centres. Prenat Diagn 2008;28:914–19.

Associazione Italiana di Citogenetica Medica (A.I.C.M). Diagnostica Citogenetica Consensus, 1995.

Young C et al.: Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane database Syst Rev 2013 jan 31, 1:CD000114

Wax JR et al.: First trimester transabdominal chorionic villus sampling – does the needle matter? J Clin Ultrasound 2012 Sep;40(7):385-388

Alfirevic Z, von Dadelszen P.: Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane Database Syst Rev 2003;CD000114.

Odibo AO, et al.: Evaluating the rate and risk factors for fetal loss after chorionic villus sampling. Obstet Gynecol 2008;112:813–19.

Brambati B, et al.: First 10.000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. Prenat Diagn. 1998; 18: 255-266

Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group. Multicentre randomized clinical trial of chorionic villus sampling and amniocentesis. Lancet, 1989; I: 1-6

Jackson LG et al.: A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic villus sampling. New Engl J Med 1992; 237 (9):549-598

Monni G et al.: Transabdominal chorionic villus sampling: fetal loss rate in relation to maternal and gestational age. Prenat Diagn 1992 Oct12 (10): 815-820

Davies c, et al.: Amniocentesis and women with hepatitis B, hepatitis C, or human immunodeficiency virus. J Obstet Gynaecol. Can., 2003; 25 (2): 145-152

Firth HV, et al.: Severe limb abnormalities after chorionic villus sampling at 56–66 days' gestation. *Lancet* 1991;337:762–3.

National Institute of Child Health and Human Development. Report of the NICHD workshop on chorionic villus sampling and limb and other defects. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1–6.

Hahnemann JM, Vejerlev LO: Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling. Diagnostic consequence of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Pren Diagn*, 1997; 17 (9): 801-820

Kuliven A et al.: Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagn*. 1993; 13:197-209

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Use of Anti-D Immunoglobulin for Rh Prophylaxis. Green-top Guideline No. 22. London: RCOG 2002

Kuliven A et al.: Chorionic villus sampling safety report oh WHO/Euro meeting. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174: 807-811

Lundsteen C, Vejerslev LO: Prenatal diagnosis in Europe. *Eur J Genet* 1997; 5(suppl. 1): 14-21

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Amniocentesis and chorionic villus sampling. Guidelines No. 8. London: RCOG 2010

Tabor A et al.: Randomized controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986; 1 (8493): 1287-1293

Tabor A, Vestergaard CHF, Lidegaard O. Fetal loss after chorionic villus sampling and amniocentesis:an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:19–24.

Antsaklis Aet al.: Second-trimester amniocentesis vs. chorionic villus sampling for prenatal diagnosis in multiple gestations. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;20:476–81.

The canadian Early and Midtrimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. Randomized trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet* 1998; 351 (9098): 242-247

Tongson T et al.: Amniocentesis-related fetal loss: a cohort study. *Obtest Gynecol* 1998; 92 (1): 64-67

Romero R, et al.: Sonographically monitored amniocentesis to decrease intra-operative complications. *Obstet Gynecol* 1985;65:426–30.

Somigliana F et al.: Early invasive diagnostic technique in pregnant women who are infected with the HIV: a multicenter case series. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(2): 437-442

Ekouko D, et al.: Amniocentesis in pregnant HIV-infected patients: absence of mother-to-child transmission in a series of selected patients. *Eur J Obstet Gynecol Repro Biol* 2008;140:212–17.

Pardi G et al.: Cord sampling for the evaluation of oxygenation and acid-base balance in growth-retarded human fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1221-1228

Daffos F et al.: Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: a study of 606 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153 (6): 655-660

Metcalfe SA. Carrier screening in preconception consultation in primary care. *J Community Genet* 2012;3:193–203.

Maruotti GM, Frisso G, Calcagno G, et al. Prenatal diagnosis of inherited diseases: 20 years' experience of an Italian Regional Reference Center. *Clin Chem Lab Med* 2013;11:1–7.

Moi P, Paglietti E, Sanna A, et al. Delineation of the molecular basis of delta- and normal HbA2 beta-thalassemia. *Blood* 1988;72: 530–3.

Muller F, Simon-Bouy B, Girodon E, et al. Predicting the risk of cystic fibrosis with abnormal ultrasound signs of fetal bowel. Results of a French molecular collaborative study based on 641 prospective cases. *Am J Med Genet* 2002;110:109–15.

Genetic Testing for Cystic Fibrosis. NIH Consensus Statement Online 1997;15:1–37.

American College of Obstetricians and Gynecologists, and American College of Medical Genetics Preconception and prenatal carrier screening for cystic fibrosis. Clinical and Laboratory Guidelines. American College of Obstetricians and Gynecologists; Washington, DC; 2001.

Castaldo G, Rippa E, Sebastio G, et al. Detection of five rare cystic fibrosis mutations peculiar to Southern Italy: implication in screening for the disease and phenotype characterization for patient with CFTR homozygote mutations. *Clin Chem* 1999;45:957–62.



Denayer L, Welkenhuysen M, Evers-Kiebooms M, et al. Risk perception after CF carrier testing and impact of the test result on reproductive decision making. *Am J Med Genet* 1997;69:422–6.

Martinelli P, Maruotti GM, Pasquali D, et al. Genetic prenatal RET testing and pregnancy management of multiple endocrine neoplasia Type II A (MEN2A): a case report. *J Endocrinol Invest* 2004;27: 357–60.

D’Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, et al. Spinal Muscular Atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:71.

Novak MJ, Tabrizi SJ. Huntingtons disease. *BMJ* 2010;340:c3109.

Duncan RE, Foddy B, Delatycki MB. Refusing to provide a prenatal test: Can it ever be ethical? *BMJ* 2006;333:1066–8

ORIGINAL PAPER

## Prenatal screening and counseling for genetic disorders

Giuseppe Maria Maruotti<sup>1</sup>, Laura Sarno<sup>1</sup>, Stefania Simioli<sup>1</sup>, Giuseppe Castaldo<sup>2</sup>, and Pasquale Martinelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, Reproductive and Dentistry Sciences, Naples, Italy and <sup>2</sup>CEINGE – Advanced Biotechnologies, Naples, Italy

### Abstract

**Introduction:** The carriers of the same autosomal recessive disorder are usually unaware of onset of the genetic diseases in the children even if screenings are available for many of these disorders. In this paper, we report the experience of the Prenatal Diagnosis Center of AOU Federico II and we discuss the role of the screening for beta-thalassemia (BT), cystic fibrosis (CF) and for other rare genetic disorders.

**Materials and Methods:** We analyzed retrospectively the indication for Prenatal Diagnosis (PD) of all the couples referred to our center from January 1993 to May 2013. We divided our sample into three groups: couples at high risk for BT, for CF and for other rare genetic disorders.

**Results:** From January 1993 to May 2013, we performed 1269 PD for genetic disorders. There are still couples who discovered to be carriers of BT by screening after the birth of the affected child ( $n = 51$  (11.3%)); the majority of the people were screened for CF carrier after the birth of an affected child ( $n = 155$  (80.7%)) or through the cascade screening ( $n = 28$  (14.6%)). Large-scale screenings for rare genetic conditions are not available and people were screened only if they have a positive familial history.

**Conclusion:** Parental screening is available for many severe and rare diseases whose genetic origin is known. The proportion of patients referred for very high-risk indications increased over time with an higher demand for rare disease. An adequate counseling is fundamental to identify women at risk for having affected child. Screening, counseling and PD of genetic diseases is a complex matter and needs for a continuous update.

### Introduction

Public demand for prenatal screening, counseling and prenatal diagnosis (PD) of genetic diseases has increased during the past decade worldwide. PD is an area where technology is advancing rapidly offering an increasing array of tests to women getting information about the health of the fetus. Many of this genetic disorder are life-threatening or chronically debilitating diseases. The carriers of the same autosomal recessive disorder are usually unaware of onset of the genetic diseases in the children even if screenings are available for many of these disorders. The aim of the screening is to enable carrier couples to be informed of the risk of having an affected child, making possible consideration of all reproductive options. Preconceptional consultation in primary care is fundamental to identify couple at risk for genetic disorders, to propose the available preconceptional screenings and to start pregnancy conscious of all the possible risks [1]. The most widespread carrier screenings are those for beta-thalassemia (BT) and cystic fibrosis (CF), that are the two most frequent genetic disorders in our area. However, large-scale screenings for rare genetic conditions are not available and people were screened only if they have a positive familial history. In this

### Keywords

Beta-thalassemia, cystic fibrosis, genetic counseling, prenatal screening, rare genetic diseases

### History

Published online 19 September 2013

paper, we report the experience of the Prenatal Diagnosis Center of AOU Federico II and we discuss the role of the screening for BT and CF and for other rare genetic disorders, highlighting important ethical and socio-economical issues related to genetic counseling and parental screening.

### Materials and methods

We analyzed retrospectively the indication for PD of all the couples referred to our center from January 1993 to May 2013. We divided our sample into three groups: couples at high risk for BT, for CF and for other rare genetic disorders. The Rare Diseases Act of 2002 defines rare disease any disease generally considered to have a prevalence of fewer than 200 000 affected individuals in the United States [2]. Differences among groups were evaluated using Chi-square test for categorical variables and ANOVA test for continuous variables. The indications for parental screening were retrospectively collected. Data were analyzed by SPSS 18.0.

### Results

From January 1993 to May 2013, we performed 1269 PD for genetic disorders. Among these, 190 (14.9%) were amniocentesis and 1079 (85.1%) were chorionic villus samples (CVS). 528 (41.6%) couples were referred to our centre for PD of BT, 192 (15.1%) underwent a PD for CF and 549 (43.3%) for other rare genetic disorders. Clinical and

Address for correspondence: Prof. Pasquale Martinelli, Department of Neurosciences, Reproductive and Dentistry Sciences, Naples, Italy.  
E-mail: martinelli@unina.it



Table 1. Clinical and anamnestic characteristics of women at risk for having a children affected by BT, FC and other rare genetic disorders.

Variable	FC N=192 (15.1%)	BT N=528 (41.6%)	Rare genetic disorders N=549 (43.3%)
Age*			
Years (mean $\pm$ SD)	31.4 $\pm$ 0.4	29.2 $\pm$ 0.2	30.8 $\pm$ 0.2
Amniocentesis*			
N (%)	17 (8.9%)	45 (8.5%)	148 (26.1%)
Gestational age			
Weeks (mean $\pm$ SD)	18.6 $\pm$ 3.9	17.7 $\pm$ 2.2	17.3 $\pm$ 2.1
CVS*			
N (%)	175 (91.1%)	483 (91.5%)	421 (73.9%)
Gestational age			
Weeks (mean $\pm$ SD)	11.5 $\pm$ 1.2	11.5 $\pm$ 1.4	11.8 $\pm$ 1.3
>1 PD in our center*			
N (%)	72 (37.5%)	292 (58.3%)	232 (40.8%)
Twin pregnancies			
N (%)	2 (1.0%)	8 (1.5%)	3 (0.5%)
Number of pregnancies*			
Median	3	2	2

\* $p < 0.001$  (ANOVA Test).

Table 2. Number of PD for rare genetic disorders stratified by prevalence (number of cases).

>1:50000 N=372 (67.8%)	1:50000-1:100000 N=99 (18.0%)	<1:100000 N=78 (14.2%)
Acondroplasia (11)	Argininosuccinic Aciduria (5)	APECED Syndrome (1)
Alpha-thalassemia (6)	Carbonic Anhydrase II deficiency (2)	Bruton's disease (2)
Angelman Syndrome (6)	Choroideremia (2)	Canavan Disease (5)
Autosomal dominant deafness 3A (5)	Friedreich's Ataxia (1)	Carbamoyl phosphate synthetase deficiency (3)
Centronuclear myopathy (3)	Galactosemia (3)	Pyruvate Carboxylase Deficiency (1)
Congenital 21-OH deficiency (12)	Glycogen Storage Disease Type Ib, II and III (13)	Ethylmalonic encephalopathy (2)
Congenital Disorders of Glycosylation 1a (1)	Holt-Oram Syndrome (2)	Fanconi Anemia (6)
Facioscapulohumeral muscular dystrophy 1* (1)	Krabbe Leukodystrophy (8)	Glycogen Storage Disease Type IV (2)
Familial Adenomatous Polyposis 1 (1)	Lymphoedema (1)	Gangliosidosis Type 1 and 2 (7)
Fragile X Syndrome (40)	MEN 1 e 2 (3)	HHH Syndrome (1)
Glycine encephalopathy (3)	Methylmalonic Aciduria (14)	Lesch-Nyhan syndrome (4)
Haemophilia A and B (63)	Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB (17)	Lysinuric Protein Intolerance (1)
Huntington's Disease (11)	Papillon-Leage-Psaume Syndrome (1)	Maple syrup urine disease type II (1)
Myotonic Dystrophy Type 1 (16)	Propionic Acidemia (2)	Metatropic Dysplasia (1)
Muscular Dystrophy (99)	SCID (5)	Molybdenum cofactor deficiency (1)
Neuromuscular ceroid lipofuscinosis (1)	Shwachman Diamond Syndrome (1)	Mucopolysaccharidosis Type II (19)
Ornithine Transcarbamylase Deficiency (4)	Smith-Lemli-Opitz (11)	Niemann-Pick Disease (11)
Propionic Acidemia (2)	Spinocerebellar Ataxia 1 and 2 (5)	Nonketotic hyperglycinemia (6)
Phenylketonuria (10)	Zellweger Syndrome (3)	Progeria (1)
Pyruvate Kinase Deficiency (1)		Schimke immuno-osseous dysplasia (1)
Rett Syndrome (3)		Wiskott Aldrich Syndrome (2)
Spinal Muscular Atrophy (57)		
Spinocerebellar Ataxia 3 (4)		
Tuberous Sclerosis (9)		
Von Hippel-Lindau Disease (1)		
X-Linked hydrocephalus (2)		

anamnestic characteristics of each group were reported in Table 1. The group of rare genetic disorders includes more than 70 different diseases; the frequencies of genetic disorders stratified by prevalence are reported in Table 2. 69 (12.6%) out of 549 PD were performed for autosomal dominant diseases, 237 (43.2%) for autosomal recessive diseases and 243 (43.2%) for recessive X-linked disease. Indications for prenatal screening were reported in Table 3. For 77 (14.6%) out of 528 couples carriers of BT, data were missed, while we did not have missing data among FC carriers couples and for the group of rare genetic disorders.

## Discussion

In this paper, we describe our experience on the role of parental screening for different genetic disorders in a population of

pregnant women booked for PD. For a better understanding of the role of the prenatal screening in each situation we decide to divide our sample into three groups: couples at high risk for BT, for CF and for rare genetic disorders. BT and CF are the most common genetic disorders in our area and a parental screening is well accepted; the low incidence of the rare genetic disorder does not give space to a large scale screening. The increased demand for genetic counseling and prenatal diagnosis genetic and rare diseases observed in these last years was registered also in our Center [3].

As shown in Table 3, there are still couples who discovered to be carriers of BT by screening after the birth of the affected child; the percentage of these couples is really low because our region is an endemic area where the cost-effectiveness of prenatal screening is widely approved. The screening tests

Table 3. Indications for Parental screening.

Indications	CF N = 182	BT N = 451	Rare genetic disorders N = 549
Affected child(ren) N (%)	155 (80.7%)	51 (11.3%)	190 (34.6%)
Cascade screening N (%)	28 (14.6%)	41 (9.1%)	251 (45.7%)
Prenatal screening N (%)	—	153 (33.4%)	—
Preconceptional screening N (%)	5 (2.6%)	206 (45.7%)	—
Fetal bowel ultrasound abnormalities N (%)	4 (2.2%)	—	—
One parent affected N (%)	—	—	108 (19.8%)

are based on accurate measurements of hematological parameters, iron deficiency evaluation and separation of Hb fraction [4]. Even if screening should be offered to all women of childbearing age, the percentage of screening occurred during pregnancy is still high.

Contrary to BT, the majority of the people were screened for CF carrier after the birth of an affected child or through the cascade screening, while the percentage of couples who performed a preconceptional screening is really low. Fetal bowel ultrasound abnormalities are reported among the indications for the screening because bowel hyper echogenicity and loop dilation are associated with a risk of CF of about 3% [5]. Cascade screening is a mechanism for identifying people at risk for a genetic condition by a process of systematic family tracing. For this reason, in our series couples at risk for CF required a PD later than ones at risk for BT (Table 1). Even if a consensus conference at NIH recommended, since 1997, that CF carrier screening should be offered to all pregnant couples and those contemplating pregnancy [6], there are many difficult correlated to the introduction of a large-scale screening. First of all, there is an inability to identify carriers by clinical or biochemical means and the only possibility is the genetic test, with high costs for the couple. Moreover, the big heterogeneity of CFTR mutations interferes with the implementation of screening. Since the discovery of the first CFTR mutation (F805del) in 1989, more than 1900 different changes have been found in this gene, while the American College of Medical Genetic proposed a 25 mutation panel for the screening [7]. This panel is very sensitive for Ashkenazi Jewish descendents (97%) and less sensitive for Southern Europe (70%). Therefore, in addition to the screening for frequent mutations, according to the European recommendations, a complementary panel may be required to test population-specific mutations with a frequency above 1%; for this reason, up to 2001, we include five mutations peculiar to Southern Italy [8]. However, because screening is offered only for the more frequent mutations, a negative screening does not exclude the chance of being a CF carrier. Many studies demonstrated that often people misunderstand CF carrier screening results and they underestimate the residual risk [9]. Moreover, many CFTR mutations are of unknown clinical significance making really difficult the genetic counseling. The different survival rate of people affected by CF through the years must be discussed with the couple. Only thirty years ago, a CF patient was not expected to reach adulthood, while, nowadays, many people even live into their fifties and sixties.

In the group of rare genetic disease, the genetic study of the high risk couples was always performed after the birth of an affected child or for a positive familiar history; it is impossible

to offer a parental screening for all known possible genetic disorders to the pregnant population. More than 70 different genetic diseases are included (Table 2) in PD of our Center and 78 (14.2%) procedures were performed for diseases with an prevalence less than 1 in 100 000. The demand for screening for extremely rare diseases is increasing, giving points for reflection on other important ethical issues; variable expressivity, genotype-phenotype variability, adult or early onset disease are issues that often makes really difficult the genetic counseling and the performance of the PD. For these reasons, it is really important to offer the screening and the PD after a complete counseling, to explain all the performance of PD and all the possible options of the procedure. Couples should be aware that often the results of PD are not able to predict the age of onset, the clinical course or the degree of disability. Moreover, relevant in the counseling is the explanation of the type of disease, of clinical signs, onset of disease, outcome and possible therapy. The consultant and the obstetric must outline to the high risk couples the options of the single specific genetic disorders. For example, there are no more indications for PD of the autosomal recessive disease Phenylketonuria because we know that diet influence phenotypic expression. Dietary protein restriction and supplementation with phenylalanine-free medical foods are good solutions for a normal neurological development. There is a mandatory neonatal screening that give us the possibility to perform a diagnosis within 48–72 h from the birth.

Other criticism arise from some autosomal dominant disease. The Familial Adenomatous Polyposis (FAP), an autosomal dominant disease is characterised by predisposition to late onset colon polyposis and colorectal cancer, caused by germline mutations in the APC gene. The FAP prophylaxis is possible and consists of resection of the entire large bowel, to prevent malignant transformation, but these surgical procedures shorten the life expectancy and reduce the quality of life. We may think if is ethically correct to perform this diagnosis in a family with history of disease in one of the parents.

In many cases of autosomal dominant disease, when the mother is affected, PD has a central role for a correct management of pregnancy. For example, for women with a diagnosis of MEN 2A, it has recently been shown that PD and a correct management could improve survival and outcome drastically reducing maternal and fetal mortality. RET mutations are associated with three risk levels of developing medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. Therefore, genetic counseling and PD are mandatory to assuring parents on the life-long risk of tumors, avoiding psychological distress that can further complicate pregnancy in affected women [10].

Another important issue in genetic counseling is the possible residual risk after molecular testing. For example, in couple at risk for Spinal Muscular Atrophy, reported in our series in 57 cases (10.4%), the sensitivity of the molecular test is 93–95%; therefore, carrier test does not always identify the disease because parents may be carriers of rare subtle mutations and, moreover, the occurrence of extremely rare de novo mutations is possible [11]. Therefore, the physician must highlight the possible residual risk.

Important ethical issues are related to adult onset of the diseases, like Huntington's Disease (HD). It is a dominantly inherited human neurodegenerative disorder characterized by motor deficits, cognitive impairment, and psychiatric symptoms leading to inexorable decline and death, starts generally in every age [12]. It has an incidence of 1 in 25000 people. In all the couples undergoing the PD, there was one parent affected, screened because of a positive familial history. This test is available since 1993, when the gene involved in HD was discovered. It gives the possibility to confirm the diagnosis in case of people with symptoms that suggest HD or to inform a person that could develop the disease during his life. This test cannot give information about the severity of the syndrome or the age of development of the disease. The obstetricians and the geneticists must outline during the counseling the variability of phenotype and the interaction between age of onset, symptomatology and penetrance. In Huntington's disease, as in other adult onset disorders, the physician must take into account when counseling the possibility that the parents will declare a wish to continue with the pregnancy despite a positive prenatal test result; this presents other ethical questions [13]. In fact, on one hand it could prevail the parents' right to know the genetic status of their future yet unborn child for a late onset genetic disorder, on another hand it could prevail the right of the future child not to know a genetic diagnosis, or to decide for oneself when to have a diagnosis. This is very important, particularly in case where there is no cure for a condition.

In conclusion, parental screening is available for many severe and rare diseases whose genetic origin is known; the our PD Unit in collaboration with CEINGE is part of an International Network for the diagnosis of all the diseases whose genetic diagnosis is possible. The proportion of patients referred for very high-risk indications increased over time with an higher demand for rare disease. We observed an increment of the numbers of the prenatal invasive procedures and an increment of variation of the type of disease for which the PD is possible. It is impossible to screen women at childbearing age for all the possible genetic

disorders; for this reason an adequate anamnesis and counseling is fundamental to identify women at risk for having affected child. A multidisciplinary team of prenatal diagnosis with a gynecologist, a genetic medical, a molecular biology medical and psychologist is necessary for the relevance of the disease. The members of the team must pay more attention in the counseling to the moral character of choices about prenatal diagnosis. Genetic counseling must promote appropriate and medical interventions when available and facilitate personal decision making when interventions are supportive. In any case screening, counseling and PD of genetic diseases is a complex matter and needs of a continuous updates.

### Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

### References

1. Metcalfe SA. Carrier screening in preconception consultation in primary care. *J Community Genet* 2012;3:193–203.
2. Rare diseases act of 2002. PUBLIC LAW 107–280—Nov 6, 2002.
3. Maruotti GM, Frisso G, Calcagno G, et al. Prenatal diagnosis of inherited diseases: 20 years' experience of an Italian Regional Reference Center. *Clin Chem Lab Med* 2013;11:1–7.
4. Moi P, Paglietti E, Sanna A, et al. Delineation of the molecular basis of delta- and normal HbA2 beta-thalassemia. *Blood* 1988;72:530–3.
5. Muller F, Simon-Bouy B, Girodon E, et al. Predicting the risk of cystic fibrosis with abnormal ultrasound signs of fetal bowel. Results of a french molecular collaborative study based on 641 prospective cases. *Am J Med Genet* 2002;110:109–15.
6. Genetic Testing for Cystic Fibrosis. NIH Consensus Statement Online 1997;15:1–37.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists, and American College of Medical Genetics Preconception and prenatal carrier screening for cystic fibrosis. Clinical and Laboratory Guidelines. American College of Obstetricians and Gynecologists; Washington, DC; 2001.
8. Castaldo G, Ripa E, Sebastio G, et al. Detection of five rare cystic fibrosis mutations peculiar to Southern Italy: implication in screening for the disease and phenotype characterization for patient with CFTR homozygote mutations. *Clin Chem* 1999;45:957–62.
9. Denayer L, Welkenhuysen M, Evers-Kiebooms M, et al. Risk perception after CF carrier testing and impact of the test result on reproductive decision making. *Am J Med Genet* 1997;69:422–6.
10. Martinelli P, Maruotti GM, Pasquali D, et al. Genetic prenatal RET testing and pregnancy management of multiple endocrine neoplasia Type II A (MEN2A): a case report. *J Endocrinol Invest* 2004;27:357–60.
11. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, et al. Spinal Muscular Atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:71.
12. Novak MJ, Tabrizi SJ. Huntingtons disease. *BMJ* 2010;340:c3109.
13. Duncan RE, Foddy B, Delatycki MB. Refusing to provide a prenatal test: Can it ever be ethical? *BMJ* 2006;333:1066–8.





Università di Bologna  
Clinica Ostetrica e Medicina dell'Età Prenatale  
Direttore: Prof. Nicola Rizzo



ed Odontostomatologiche  
Direttore: Prof. Andrea L. Tranquilli



Comune di Numana

Il Workshop si svolge sotto il patrocinio di:  
Alma Mater Studiorum - Università di Bologna  
Università Politecnica delle Marche - Facoltà di Medicina  
Associazione Ginecologi Universitari Italiani (A.G.U.I.)  
Associazione Ginecologi Italiani in Formazione (A.G.I.F.)  
Società Italiana di Medicina Perinatale (S.I.M.P.)  
Associazione Italiana Preeclampsia (A.I.P.E.)  
Comune di Numana

# Nu Madre & feto na

Un workshop scientifico  
per giovani ricercatori

Numana (AN)  
12 - 14 maggio 2011

iscrizioni e informazioni [www.madrefeto.it](http://www.madrefeto.it)

foto di Ulderico Lucchetti

#### Segreteria scientifica

Dott. Stefano R. Giannubilo  
Clinica Ostetrica e Ginecologica  
Ospedale "G. Salesi"  
Via Corridoni, 11 - 60123 Ancona  
Tel. 071 5962214 - Fax 071 365575

Dott.ssa Giuliana Simonazzi  
Clinica Ostetrica e Medicina dell'Età Prenatale  
Policlinico Sant'Orsola Malpighi  
Via Massarenti, 13 - 40138 Bologna  
Tel. e Fax 051 6364393

#### Segreteria organizzativa

**ADVANCED** meeting solutions  
Ancona - tel. 071 55165 - Fax 071 55451  
[www.advancedcongressi.it](http://www.advancedcongressi.it)



**METODI.** È stato analizzato tessuto placentare di feti nati morti (Apgar 0 al 1° minuto ed età gestazionale > 22 settimane) e di feti nati vivi da gravidanze fisiologiche, come controlli. È stato adottato un protocollo clinico che includeva: accertamenti biochimici e colturali, autopsia ed esame istologico placentare. La causa di natimortalità è stata classificata mediante un processo di audit multidisciplinare secondo la classificazione di Wigglesworth e Aberdeen. L'analisi genomica è stata condotta utilizzando Illumina SNP arrays (HumanCNV370 Duo) ad alta risoluzione sui campioni placentari e fetali. È stata quindi eseguita validazione dei risultati con 3 metodiche indipendenti (PCR quantitativa, Illumina 1M e Agilent 105K CGH arrays). **RISULTATI.** Nella nostra casistica di 54 MEF, 29 sono state classificate come "inspiegate". Fra queste abbiamo identificato 24 possibili CNVs nuove. Al processo di validazione sono state confermate 18 delle 24 CNVs (75%) nei tessuti placentari, 8 delle quali sono state confermate anche nei tessuti fetali disponibili; nessuna di queste è stata riscontrata nel sangue materno.

**CONCLUSIONI.** Abbiamo dimostrato che l'analisi genomica placentare può essere utilizzata per l'identificazione di CNVs de novo in corti ben caratterizzate di MEF inspiegate. Emerge quindi il potenziale utilizzo dell'analisi genomica placentare per identificare varianti genomiche submicroscopiche e supportare il valore di future analisi su più larghe popolazioni di studio.

### **36. TALASSEMIA, PREECLAMPSIA E VILLOCENTESI: ESISTE UNA CORRELAZIONE?**

L. Sarno, GM Maruotti, R. Napolitano, G. Mallia Milanese, S. Simioli, A. Capone, M. Morlando, D. Di Fraja, P. Martinelli.

*Dipartimento di Ginecologia e Ostetricia, Università di Napoli  
Federico II*

**OBIETTIVO.** Valutare qual è il rischio di sviluppare preeclampsia in pazienti che si sono sottoposte a villocentesi.



**MATERIALI E METODI.** Le pazienti che si sono sottoposte a villocentesi per diagnosi prenatale di beta-talassemia presso il nostro centro tra il 2001 e il 2008 sono state messe a confronto con un gruppo di pazienti a basso rischio. L'incidenza di preeclampsia è stata valutata nei due gruppi.

**RISULTATI.** Tra le pazienti che hanno avuto una villocentesi (n=290), 71 (24,4%) sono state escluse perché non hanno portato a termine la gravidanza o per perdita dell'outcome. Le rimanenti 219 sono state messe a confronto con un gruppo di controllo (n=553). Cinque pazienti (2,2%) nel primo gruppo e 48 (8,6%) nel gruppo di controllo hanno sviluppato una preeclampsia ( $\chi^2 = 5.44$ ;  $p = 0.19$ ; OR = 0.32; 95% CI 0.2–0.82).

**CONCLUSIONI.** Nel nostro studio, la villocentesi sembra avere un ruolo protettivo sullo sviluppo di preeclampsia. Il danno locale provocato da tale procedura alla placenta potrebbe innescare dei meccanismi di rimodellamento che migliorerebbero l'invasione trofoblastica delle arteriole spirali. Studi precedenti, inoltre, hanno dimostrato che in pazienti con basse concentrazioni di emoglobina l'invasione trofoblastica delle arteriole spirali è esaltata. Questo pone spunti di riflessione su una possibile connessione tra la presenza di un trait talassemico, l'esecuzione di prelievi di materiali placentari e lo sviluppo di preeclampsia.

### **37. FATTORI DI VIRULENZA E PERSISTENZA DELL'INFEZIONE DA HELICOBACTER PYLORI NELLA PREECLAMPSIA COMPLICATA DA RESTRIZIONE DI CRESCITA FETALE**

Annalisa Piazzese<sup>1</sup>, Alessandro Rolfo<sup>1</sup>, Simona Cardaropoli<sup>1</sup>, Antonio Ponzetto<sup>2</sup>, Tullia Todros<sup>1</sup>



## ***b) Diagnosi prenatale della Sindrome della Rosolia Congenita***

Il termine “Congenital Rubella Syndrome” (CRS) è utilizzato per definire tutte le manifestazioni cliniche, precoci o tardive, conseguenza dell’azione lesiva del rubeovirus sul prodotto del concepimento. Sebbene il virus possa infettare e danneggiare qualunque organo fetale, le manifestazioni cliniche classiche e più frequenti della CRS sono riassunte nella cosiddetta triade di Gregg che include:

- **difetti oculari**, tra cui la cataratta congenita, la microftalmia, la retinopatia pigmentaria e il glaucoma;
- **difetti cardiaci**, quali pervietà del dotto arterioso di Botallo (circa il 30% dei casi), difetto del setto ventricolare, stenosi/ipoplasia dell’arteria polmonare, coartazione aortica;
- **difetti uditivi**, ed in particolare la sordità neurosensoriale, la più frequente manifestazione clinica della rosolia congenita e spesso la sola dopo il quarto mese di gestazione.

Questi rappresentano, insieme al ritardo mentale, le caratteristiche cliniche principali della CRS. Rientrano nell’ampio spettro dei possibili difetti della sindrome congenita anche la trombocitopenia con porpora, l’epatite/epatosplenomegalia, le alterazioni ossee, le anomalie dentarie, l’ipospadia, il criptorchidismo, l’ernia inguinale, la polmonite interstiziale, la meningoencefalite, le calcificazioni cerebrali, la nefrosclerosi e la nefrocalcinosi.

Oltre a queste manifestazioni cliniche ad insorgenza più o meno precoce, ovvero presenti alla nascita o nella prima infanzia, sono stati riportati anche alcuni casi con manifestazioni tardive della malattia che comprendono:

- ❖ diabete mellito di tipo1 (> 20%, entro l’età dei 35 anni);
- ❖ disfunzione tiroidea, nel 5% degli individui in età adolescenziale;
- ❖ panencefalite progressiva, un rarissimo ma fatale disordine neurodegenerativo.

Da ricordare, inoltre, che circa il 50% dei bambini con CRS si mostrano normali alla nascita e che l'infezione può causare morte fetale, aborto spontaneo o parto prematuro.

Nelle donne gravide, il virus della rosolia può infettare la placenta nel corso della fase viremica e replicarsi al suo interno causando eventuali danni fetali. L'infezione del feto può avvenire a qualunque stadio della gravidanza; tuttavia il rischio dipende dall'età gestazionale in cui la donna contrae l'infezione. Si passa, infatti, dall'81 % nel primo trimestre e, in particolare, nelle prime 10 settimane di gestazione, al 54% a 13-14 settimane fino al 25% alla fine del secondo trimestre ritornando, infine, più alto nel corso degli ultimi mesi, dal 35% a 27-30 settimane fino al 100% oltre le 36 settimane di gestazione. Tuttavia, anche se il feto è infettato dal virus, non sviluppa necessariamente delle malformazioni congenite. Il rischio stimato di malformazioni fetali in risposta ad una infezione da rubella virus varia dal 90%, quando l'infezione è contratta nelle prime 10 settimane di gestazione, al 33% se contratta a 11-12 settimane, 11% a 13-14, 24% a 15-16 settimane, con assenza totale di malformazioni nella fase successiva della gravidanza. Sebbene il rischio d'infezione fetale sia molto alto quando la donna contrae un'infezione primaria, esistono report che descrivono casi di CRS anche dopo reinfezione. La reinfezione, che consiste nell'infezione dell'organismo da parte del virus della rosolia da cui era già stato precedentemente infettato, è piuttosto comune nella popolazione femminile nel corso della gravidanza (>50% nelle donne vaccinate contro la rosolia e 5% nelle pazienti naturalmente immuni) e risulta essere spesso subclinica ed associata a un basso rischio teratogeno; il rischio di CRS dopo reinfezione risulta essere tra il 5% e l'8%, nel corso del I trimestre. Non sono stati riportati casi di CRS in bambini nati da madri che avevano contratto la reinfezione dopo le prime 12 settimane di gravidanza.

Quando una donna contrae un'infezione in gravidanza, confermata dalla positività clinica e/o sierologica, utile è proporre una diagnosi prenatale. Sebbene la diagnosi di un feto infetto non rappresenti la certezza di un feto malformato, essendo il tasso di CRS molto più basso rispetto a quello d'infezione materna, essa può aiutare i genitori

a definire con più dettagliate informazioni la propria decisione in merito al proseguimento o meno della gravidanza considerata. La diagnosi prenatale è utile, in particolare, in 3 differenti situazioni:

1. L'infezione primaria non può essere esclusa nel primo trimestre a causa di equivoci risultati delle IgM;
2. Le indagini sierologiche confermano un'infezione primaria durante le prime 12-18 settimane di gestazione;
3. È confermata al quadro sierologico una reinfezione materna prima delle 12 settimane di gravidanza.

Ci sono due diversi metodi per la diagnosi prenatale di rosolia accertati come efficaci, pur essendo i dati in letteratura ancora piuttosto contrastanti: l'amniocentesi, che consiste nel prelievo del liquido amniotico, e la cordocentesi, che consiste nel prelievo del sangue fetale dal cordone ombelicale per il dosaggio di eventuali IgM fetali contro il virus della rosolia e l'isolamento dell'RNA virale con PCR. Limitati sono, invece, i dati sul prelievo di frustoli di materiale deciduo-coriale. Il rilevamento virale su liquido amniotico viene effettuato con la tecnica RT-nested-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction), attraverso l'amplificazione di DNA complementare ottenuto dalla retro-trascrizione di RNA estratti da campioni cellulari virali. In un piccolo studio eseguito da Revello et al. nel 1997, sono stati analizzati 16 campioni di liquido amniotico e di sangue fetale, di cui 8 sono risultati negativi e 8 mostravano un'infezione fetale. La sensibilità e la specificità della RT-nPCR è stata dimostrata essere dagli autori pari al 100%, essendo risultati al follow-up non infetti tutti gli 8 bambini con campioni di liquido e sangue negativi e infetti i restanti 8. Il liquido amniotico risulta, da qui, essere il più adatto e qualificato campione fetale per la diagnosi prenatale d'infezione da rubella virus. Sicuramente l'amniocentesi è vantaggiosa anche perché comporta un rischio di aborto pari allo 0.5 %, molto più basso rispetto al 2% della cordocentesi. Nell'ottobre del 2004, il Journal of Clinical Microbiology ha pubblicato i risultati dello studio eseguito in Francia da Muriel Macé et Al, che hanno calcolato una sensibilità dell'RT-nPCR su liquido amniotico

tra l'83 e il 95% ed una specificità pari al 100%. Su un campione di 41 donne studiate con confermata rosolia primaria in gravidanza, l'RT-PCR su liquido amniotico è risultata positiva in 20 casi e negativa in 21, 4 dei quali presentavano IgM positive alla cordocentesi. Dei 20 bambini il cui liquido amniotico era risultato positivo, tutti presentavano anche le IgM positive e di questi solo 4 sono risultati affetti da rosolia congenita, contro i 9 sani e i 7 il cui follow-up non era noto. Su 4 bambini con RT-PCR negativa e IgM positive solo uno è risultato infetto alla nascita, mentre tutti i 17 bambini con risultati negativi di entrambe le metodiche sono risultati privi di anomalie congenite. Da qui, la dimostrazione di una sensibilità dell'amniocentesi per la diagnosi prenatale di rosolia dell'83-95%. Tale variabilità è stata dimostrata essere dipendente dal tempo in cui era prelevato il campione: l'esclusione dall'analisi finale dei casi in cui il campione di liquido amniotico era stato prelevato prima delle 6 settimane dopo l'infezione materna o in un'epoca molto precoce della gravidanza rilevava una crescita della sensibilità prossima al 100%. La specificità risultava, invece, essere del 100% poichè tutti i bambini sani non presentavano infezione prenatale.

Risulta, quindi, importante il tempo in cui viene effettuata la diagnosi prenatale: come dimostrato per l'infezione congenita da Citomegalovirus, anche per la rosolia l'intervallo ottimale di tempo tra l'infezione materna e il prelievo del campione fetale risulta essere compreso tra 6 e 8 settimane, minimizzando, così, la possibilità di risultati falsi negativi. L'età gestazionale in cui la donna contrae l'infezione è calcolata come intervallo di tempo (in settimane) intercorrente tra il primo giorno dell'ultima mestruazione e la comparsa del rash o tra il giorno del contatto con un soggetto infetto più 2 settimane. Nelle donne asintomatiche, è la sieroconversione dimostrata all'analisi sierologica a definire lo stadio della gravidanza in cui è contratta l'infezione. Anche l'età fetale al tempo del prelievo risulta essere critica per un risultato attendibile; le IgM nel sangue fetale sono fiduciosamente rilevate a partire dalle 22 settimane di gestazione mentre l'isolamento dell'acido nucleico virale nel liquido amniotico risulta essere più attendibile quando termina lo sviluppo renale

fetale, ovvero a 21-22 settimane circa di gestazione. Ad ogni modo, è importante per i genitori comprendere che questi test sono utili solo per definire l'infezione materna e fetale ma non sono in grado di confermare e o definire il tipo o livello di danno fetale. E' essenziale ottenere il consenso della madre dopo che le siano state chiaramente spiegati i rischi e i limiti dell'indagine prenatale, prima di passare alla sua realizzazione. Un ulteriore strumento d'aiuto al ginecologo/ostetrico per la diagnosi prenatale di infezione fetale è dato dall'esame ultrasonografico che può evidenziare segni ecografici di infezione virale del feto quali IUGR, ascite, idrope, ventricolomegalia, calcificazioni endocraniche, idrocefalia, microcefalia, anomalie cardiache, epatosplenomegalia, iperrecogenicità delle anse intestinali, placentomegalia e anomalie del volume di liquido amniotico. Qui di seguito sono riassunte le alterazioni visibili all'indagine ultrasonografica patognomoniche di infezione congenita da rosolia:

- anomalie del S.N.C: microcefalia, meningocele;
- anomalie cranio-facciali: cataratta, microftalmia;
- anomalie cardiovascolari: difetto del setto atriale e/o ventricolare, stenosi dell'arteria polmonare;
- anomalie gastro-intestinali: epatomegalia;
- altro: IUGR, splenomegalia, disordini renali e ipospadia.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

L'obiettivo primario dello studio è valutare l'affidabilità e l'utilità dell'amniocentesi e dell'esame ecografico per la diagnosi di rosolia congenita. Il secondo obiettivo è valutare l'outcome a distanza di un anno dei bambini nati dalle donne con l'infezione in gravidanza, evidenziando il forte impatto socio-sanitario della sindrome da rosolia congenita nella regione Campania nonostante i programmi regionali e nazionali di vaccinazione.

## MATERIALI E METODI

Nel corso degli anni 1999 – 2009, presso l'ambulatorio di Gravidanza a Rischio dell'AOU "Federico II" di Napoli, sono giunte 175 donne gravide con sospetta infezione di rosolia. Ad un'attenta anamnesi, sono stati da noi raccolti i seguenti dati:

- anagrafici (cognome e nome materno e paterno, data di nascita, residenza);
- professione e scolarità;
- data dell'ultima mestruazione (LMP) ed età gestazionale;
- numero di gravidanze (parti spontanei, tagli cesarei, interruzioni volontarie di gravidanza e aborti spontanei);
- stato immunitario della donna (screening pre-concezionale, vaccinazione, rubella in gravidanze precedenti o in infanzia);
- manifestazioni cliniche di infezione da rosolia (febbre, rash, artralgia/artrite, linfadenopatia) e data di inizio dei sintomi, se presenti;
- esposizione ad un caso noto di rosolia;
- numero di giorni intercorsi tra l'esposizione e la comparsa dei sintomi (se noto);
- numero di giorni intercorsi tra i sintomi ed il primo rubeotest;
- risultati dei test sierologici per rosolia eseguiti durante la gravidanza considerata;
- stato immunitario generale della donna (toxoplasmosi, citomegalovirus, mononucleosi, fattore reumatoide, parvovirusB19, HbsAg, HCV, HIV, VDRL e TPHA).

I dati ottenuti sono stati elaborati per fare diagnosi di:

- **infezione pregressa:** se IgG positive ed IgM negative;
- **suscettibilità:** se IgM ed IgG entrambe negative, con controlli sierologici ripetuti ogni 3-4 settimane successive per escludere un'eventuale sieroconversione;
- **infezione acuta:** se IgM positive, IgG negative o positive, bassa avidità e assenza d'infezione in atto da CMV, PB19, EBV, FR. In caso contrario, è stata

esclusa un'infezione acuta ipotizzando un errore di laboratorio o una cross-reazione;

- **reinfezione:** se in donne immuni, in particolare nelle donne vaccinate, il titolo delle IgG ha presentato un aumento se confrontato in 2 campioni sierici prelevati a distanza di 7-10 giorni l'uno dall'altro e/o le IgM da negative sono ritornate a positivizzarsi;
- **IgM-persistenti:** nelle donne portatrici croniche di IgM a basso titolo, in presenza di alta avidità e di uno stato di immunità all'anamnesi;
- **Non valutabile:** nel caso in cui i dati sierologici a nostra disposizione non siano stati sufficienti per confermare o escludere con certezza l'infezione in gravidanza.

Successivamente, abbiamo integrato i dati clinici-diagnostici ed epidemiologici per definire il caso, secondo la classificazione della CDC (Centers for Disease Control and Prevention) come sospetto, probabile, confermato o infezione asintomatica:

- **Sospetto:** qualsiasi esantema generalizzato a insorgenza acuta oppure reperto positivo per IgM rosolia-specifiche;
- **Probabile:** clinica positiva, sierologia negativa;
- **Confermato:** clinica e sierologia positiva;
- **Solo infezione:** sierologia positiva, clinica silente.

Pertanto, abbiamo classificato come casi confermati quelli d'infezione acuta, come casi possibili quelli non valutabili e con IgM persistenti e come infezioni asintomatiche le sieroconversioni clinicamente silenti e le reinfezioni, escludendo, invece, l'infezione in gravidanza in tutte le donne con diagnosi di infezione pregressa, di suscettibilità, di errore di laboratorio o cross-reazione.

Nei casi confermati è stata calcolata l'epoca gestazionale d'infezione come intervallo di tempo (in settimane) intercorso tra il primo giorno dell'ultima mestruazione e la comparsa del rash o tra il giorno del contatto (se noto) più 2 settimane; nelle donne asintomatiche, l'età gestazionale è stata calcolata in base alla data in cui si è documentata la sieroconversione. In questo modo, è stato possibile valutare le



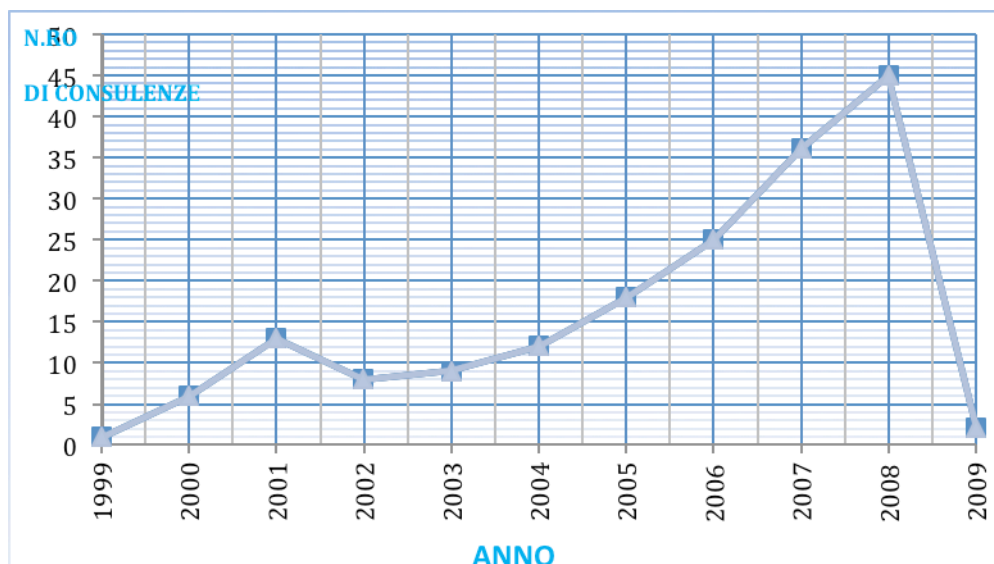
infezioni giunte alla nostra attenzione nel primo trimestre, ovvero nel periodo critico dell'organogenesi del prodotto del concepimento.

Alle donne in cui il quadro sierologico ha confermato un'infezione primaria contratta prime 12-18 settimane di gestazione, una reinfezione nel primo trimestre o nei casi in cui è stato impossibile escludere con certezza un'infezione primaria, è stata proposta la diagnosi prenatale mediante prelievo ed esame PCR su liquido amniotico, previo consenso informato della paziente. Controlli ecografici seriati ed ecocardiografia fetale sono stati eseguiti per escludere segni ecografici d'infezione virale fetale quali cataratta, microftalmia, meningocele, microcefalia, difetti del setto atriale e ventricolare, stenosi dell'arteria polmonare, epatosplenomegalia, ritardo di crescita intrauterino (IUGR). E' stato quindi possibile valutare sensibilità e specificità della diagnosi prenatale invasiva e l'efficacia del monitoraggio ecografico non invasivo nella valutazione dell'infezione fetale da virus rubeolico.

Infine, abbiamo raccolto l'outcome ad 1 anno di vita dei nati dalle donne con infezione certa in gravidanza, clinicamente manifesta o silente, e da quelle in cui non era stato possibile escludere l' infezione. I dati ottenuti riguardavano la modalità e data del parto, il sesso del nascituro, il suo peso alla nascita e soprattutto l'eventuale presenza di deficit neurosensoriali, psicomotori e cardiaci. Tali informazioni sono state ottenute attraverso interviste telefoniche e dalla consultazione di cartelle cliniche dei neonati che sono afferiti al Dipartimento di Pediatria dell'Università "Federico II" di Napoli per i controlli specialistici del caso.

## RISULTATI

Nel corso degli anni 1999-2009, sono giunte alla nostra osservazione, 175 donne gravide con sospetta infezione di rosolia. Nel grafico 1 è indicato il numero di pazienti giunte all'osservazione per singolo anno.



*Grafico 1*

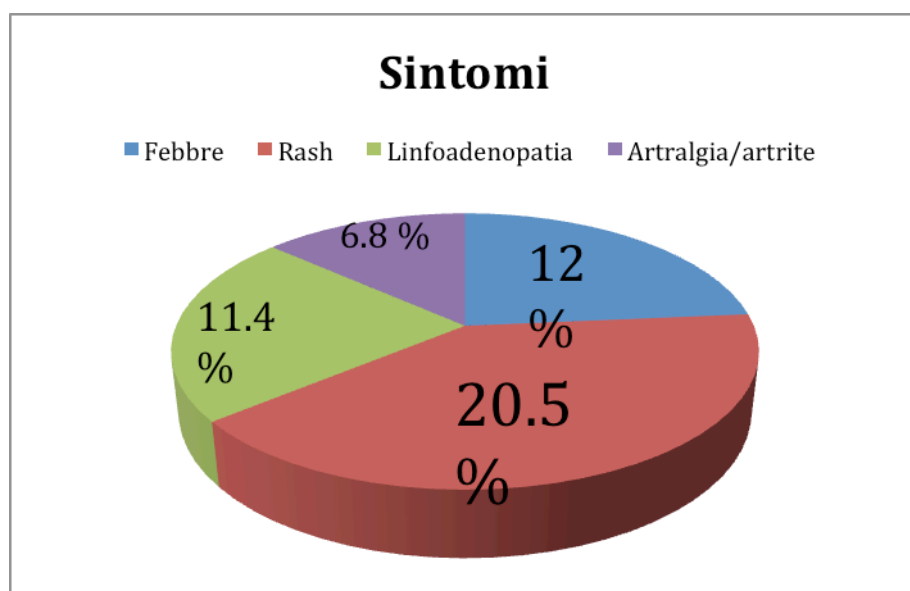
E' evidente, in accordo con i dati della letteratura, l'andamento epidemico del virus, con picchi d'infezione ogni 5 anni. Il picco di consulenze si è osservato nell'anno 2008 (45 pazienti, 25.7%).

L'età media delle pazienti arruolate era di  $28 \pm 5.9$  anni.

Il dato più interessante emerso dallo studio, riguardava lo screening pre-concezionale. Più della metà delle 175 pazienti in esame, ossia 116 donne gravide, pari al 66.2 % del totale, non avevano eseguito valutazione dello stato immunitario per rosolia prima della gravidanza in esame, nonostante il Decreto del Ministero della Sanità del 10 settembre 1998 abbia sancito "l'esclusione dalla partecipazione al costo delle prestazioni di diagnostica strumentale e di laboratorio e le altre prestazioni specialistiche necessarie ed appropriate per le condizioni patologiche che comportino un rischio materno o fetale, prescritte di norma dallo specialista". Solo il 33.7 % delle pazienti aveva eseguito lo screening pre-concezionale risultando 36 (61 %) immuni e

23 (38.9%) suscettibili all'infezione da rosolia. Tra queste ultime, solo 9 (39.1%) si erano successivamente vaccinate contro 9 pazienti che nonostante il documentato stato di suscettibilità non avevano provveduto alla vaccinazione. Sul totale di donne considerate, ben 56 (32%) riferivano di non essere proprio a conoscenza dell'esistenza di un vaccino contro la rosolia.

Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche della malattia, solo 35 (20%) donne in esame avevano riferito la comparsa di sintomi; 11 (31.4%) di queste, avevano riferito la comparsa della sintomatologia in seguito all'esposizione a un noto caso di rosolia (Grafico 2).



*Grafico 2*

I dati clinici ed epidemiologici sopra riportati sono stati da noi integrati con i dati sierologici (IgG, IgM e IgG avidity anti rubella-virus) per definire il caso come possibile/sospetto, confermato, infezione asintomatica, escluso. Alla nostra attenzione, sono dunque giunti 35 casi (20%) confermati, 83 (47.4%) possibili/non escludibili, 13 infezioni asintomatiche e 44 (25.1%) escludibili.

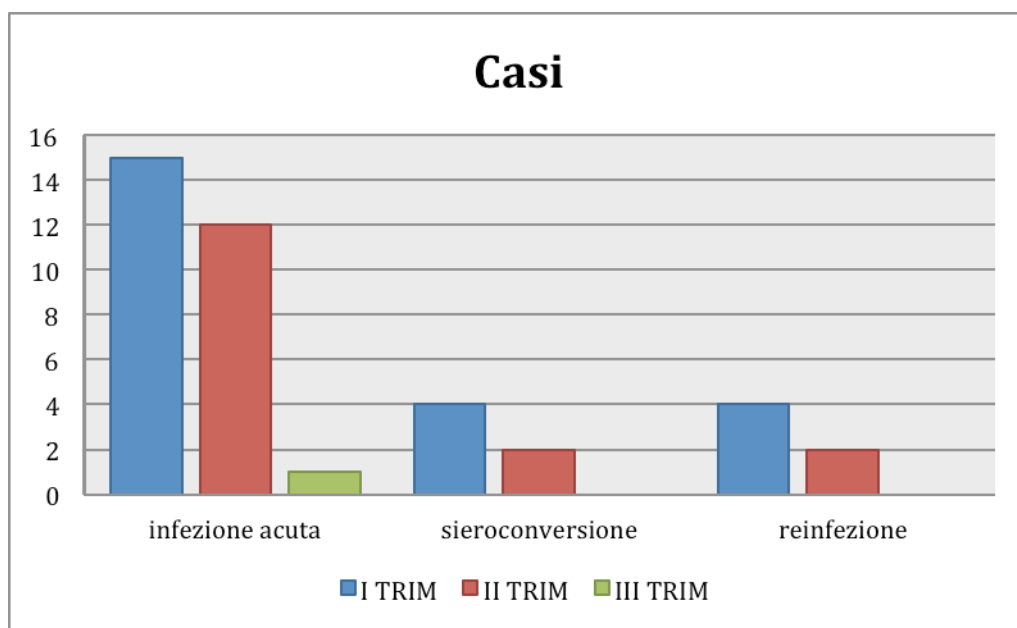
I casi confermati erano quelli con positività sia clinica che sierologica, corrispondenti alle infezioni acute in gravidanza. E' stato possibile calcolare l'età gestazionale in cui la donna aveva presumibilmente contratto l'infezione solo quando era noto il giorno

in cui era comparso il rash o in cui si era verificato il contatto con un soggetto infetto. Tale stadio della gravidanza è stato calcolato come intervallo di tempo (in settimane) trascorso tra il primo giorno dell'ultima mestruazione e la comparsa del rash o dal giorno del contatto più 2 settimane. Da ciò, è risultato che 15 (42.8%) donne avevano contratto la rosolia nel corso del primo trimestre, 12 (34.2%) nel corso del II trimestre ed una sola (2.8%) nel terzo trimestre, con un'età gestazionale media delle pazienti in esame di  $13 \pm 6.7$ .

I casi possibili sono stati classificati come tali perché non escludibili o confermabili con certezza; nello specifico, in 45 (54.2%) casi per l'assenza di dati clinici sufficienti per una diagnosi certa e in 38 (54.2%) per l'evidenza di una persistenza cronica delle IgM al quadro sierologico.

In ben 44 casi è stato possibile escludere con certezza un'infezione in gravidanza: 30 di questi (68.1%) erano "infezioni pregresse", 7 (15.9%) erano da attribuire ad errori di laboratorio, 5 (11.3%) di questi erano suscettibili all'infezione e in 2 (4.5%) casi si trattava di una cross-reazione.

I casi d'infezione asintomatica erano stati definiti come tali quando alla positività del quadro sierologico non si accompagnava la comparsa di manifestazioni cliniche in gravidanza. Le sieroconversioni si erano verificate nel corso del primo trimestre in 5 donne (38.4%), nel corso del II trimestre in 2 donne (15.3%) mentre nessuna aveva contratto un'infezione asintomatica nel corso del terzo trimestre di gravidanza. In 6 casi, infine, le pazienti avevano contratto una reinfezione: questa si era verificata nel corso delle prime 12 settimane di gestazione in 4 (66.6%) donne precedentemente vaccinate (grafico 3).



*Grafico 3*

Per quanto riguarda la diagnosi prenatale, solo 51 (29.1%) donne si erano sottoposte ad amniocentesi per l'isolamento del genoma virale su liquido amniotico mediante PCR (Tabella 1).

	N.ro infetti:	N.ro non infetti:	Totale
<b>Amniocentesi positiva</b>	2	2	4
<b>Amniocentesi negativa</b>	5	42	47
<b>Totale</b>	7	44	<b>51</b>

*Tabella 1*

Ne risulta, pertanto, una sensibilità pari al 28.5% e una specificità del 95.4%. Al monitoraggio ecografico delle pazienti in studio, in 4 (2.2%) casi si erano evidenziati segni ecografici suggestivi di infezione fetale; in due di questi le donne

avevano optato per l'aborto terapeutico. Si trattava in un caso di un feto con DIV (difetto interventricolare) riscontrato a 21 settimane di sviluppo e amniocentesi positiva al virus della rosolia; nell'altro caso il feto presentava microcefalia diagnosticata alla 20° settimana di gestazione. Le restanti due pazienti avevano invece deciso di proseguire la gravidanza e avevano partorito due neonati con sindrome da rosolia congenita, una sospetta e l'altra confermata. Nel caso sospetto il feto presentava un DIV e aumento del liquido amniotico diagnosticati nel corso della 20° settimana; nel caso confermato, invece, sono state diagnosticate all'ecografia diverse anomalie quali: IUGR, polidramnios, insufficienza atrio-ventricolare, cardiomegalia, idrocele, epatosplenomegalia, ascite, iperrecogenicità intestinale e iperplacentosi.

Per quanto riguarda l'outcome neonatale, i nati dalle donne con sospetta infezione in gravidanza, erano risultati tutti non infetti fatta eccezione per un caso di sospetta sindrome da rosolia congenita per la presenza di cardiopatia congenita (DIV e pervietà del dotto arterioso di Botallo) in assenza di altre alterazioni. Undici bambini (13.2%) erano stati persi al follow-up. che risulta ancora in corso per 3 (3.6%) nuovi nati. In 4 (4.8%) donne la gravidanza si era interrotta: aborto spontaneo in 2 casi, una morte endouterina fetale e un'interruzione volontaria di gravidanza.

Nei nati da donne con infezione confermata in gravidanza abbiamo ottenuto un numero totale di 9 infetti (25.7%) di cui 6 (66.6%) infezioni congenite asintomatiche (CRI) e 3 (33,3%) sindromi da rosolia congenita (CRS). In due neonati è stata fatta diagnosi di sindrome da rosolia congenita incompleta perché affetti da sordità in assenza di altre anomalie oculari o cardiovascolari. Il terzo, invece, aveva presentato petecchie cutanee ed epato-splenomegalia alla nascita, un DIA (difetto interatriale) e PDA (pervietà del dotto arterioso di Botallo) che si erano successivamente chiusi al compimento di 5 mesi d'età, calcificazioni periventricolari clinicamente asintomatiche e sordità bilaterale, configurando un quadro caratteristico di CRS completa. Tre bambini (8.5%) sono stati persi al follow-up e (5.7%) sono ancora in corso di valutazione. Due donne (5.7%) avevano praticato aborto terapeutico per la

presenza del virus nel liquido amniotico alla diagnosi prenatale; 6 (17.1%) pazienti avevano interrotto volontariamente la gravidanza.

Tutti i bambini nati da donne con infezione asintomatica in gravidanza erano risultati completamente sani; due (15.3%) erano stati persi al follow-up. Una (7.6%) paziente ha optato per l'aborto terapeutico per il riscontro ecografico di microcefalia (tabelle 2 e 3).

<b>Casi</b>	<b>N.ro di casi</b>	<b>N.ro di non infetti</b>	<b>N.ro di infetti CRS</b>	<b>N.ro di infetti CRI</b>
<b>Confermati</b>	35	12	3	6
<b>Possibili</b>	83	64	1	0
<b>Infezione asintomatica</b>	13	10	0	0

*Tabella 2*

<b>CRS</b>	<b>Sordità</b>	<b>Anomalie cardiovascolari</b>	<b>Calcificazioni endocraniche</b>	<b>EG infezione materna</b>
<b>1</b>	Si, bilaterale	PDA e DIA chiusi a 5 mesi	Si, periventricolari	11w
<b>2</b>	Si	No	No	15w
<b>3</b>	Si	No	Si, asintomatiche	16w
<b>4</b>	No	DIV e PDA	No	Non valutabile

*Tabella 3*

## DISCUSSIONE

Dallo studio condotto, si evince innanzitutto la scarsa conoscenza ad oggi dell'importanza dello screening- preconcezionale per verificare lo stato immunitario contro la rosolia in giovani donne in età riproduttiva e prossime ad una gravidanza. Circa 2/3 delle pazienti non avevano, infatti, praticato tale screening, nonostante il Decreto ministeriale del 1998. A più di dieci anni dall'introduzione di tale Decreto, risulta ancora un numero troppo alto di donne che non solo non si sottopongono a screening ma spesso ne sottovalutano anche l'importanza del risultato. Conoscere lo stato immunitario di una donna in età riproduttiva, consente non solo di prevenire l'infezione in gravidanza nei casi di suscettibilità all'infezione ma anche di consentire una diagnosi più rapida e sicura senza sottoporre le pazienti in esame a periodici e ripetuti controlli sierologici. Ancora più scarsa è la conoscenza delle pazienti circa l'esistenza del vaccino RA27/3 contro la rosolia e della necessità della verifica a distanza dell'efficacia della vaccinazione, che presenta un tasso di fallimento nel 5% dei casi richiedendo pertanto la somministrazione di una seconda dose. Circa il 30 % delle donne che sono giunte alla nostra osservazione aveva riferito di non essere affatto a conoscenza della possibilità di immunizzazione contro il virus rubeolico mediante vaccinazione, testimoniando la mancanza di un'adeguata campagna informativa nonostante i programmi di vaccinazione nazionali siano stati avviati già da diversi anni sul territorio. Inoltre, il 10% delle nostre pazienti che non aveva effettuato lo screening pre-concezionale era risultata all'anamnesi vaccinata contro la rosolia; in questi casi quindi le donne non avevano confermato il successo dell'immunizzazione attiva ad un successivo controllo sierologico a distanza, promuovendo i casi di reinfezione e il fallimento delle campagne di prevenzione. È dunque compito dell'ostetrico-ginecologo informare le giovani pazienti circa la possibilità di effettuare uno screening pre-concezionale e, laddove la ricerca anticorpale contro il rubella virus risultasse negativa confermando uno stato di suscettibilità all'infezione, promuovere la vaccinazione con virus vivo attenuato. In tal caso, il ginecologo deve avvertire la paziente in questione che, seppure il rischio



d'infezione e danno conseguente al feto sia solo teorico e pari all'1.3%, è opportuno almeno per i 28 giorni successivi alla vaccinazione evitare uno stato gravidico.

Tuttavia, se ciò inavvertitamente si verifica non c'è indicazione medica all'interruzione, mancando in letteratura la descrizione di casi di CRS successivi a vaccinazione effettuata durante la gestazione.

In secondo luogo, il nostro studio conferma la bassa sensibilità dell'amniocentesi nella diagnosi prenatale e la necessità di integrare questa metodica con il dosaggio delle IgM e l'isolamento mediante PCR del genoma virale su sangue fetale mediante cordocentesi, in particolare nei casi ad alto rischio, come descritto in letteratura. Tra le pazienti in esame, solo un terzo circa si è sottoposto a indagine prenatale invasiva con risultati piuttosto discordanti. In 5 neonati infetti l'esame PCR su liquido amniotico ha dato risultati falsi negativi a fronte di soli 2 casi di falsi positivi in bambini completamente sani. La sensibilità, ovvero la capacità del test invasivo di individuare i soggetti malati, è risultata di circa il 30% e molto più bassa rispetto alla capacità di individuare i soggetti sani (specificità del 95%). Da ciò si evince la scarsa affidabilità dell'amniocentesi nella diagnosi di infezione fetale e una sua più definita accuratezza nella capacità di esclusione dell'infezione suddetta. Probabilmente, la sensibilità della metodica può essere aumentata eseguendo oltre all'esame PCR su liquido amniotico anche quello su sangue fetale insieme col dosaggio delle IgM fetali mediante cordocentesi, ma non abbiamo purtroppo dati che possano confermare o escludere l'impiego di entrambe le metodiche per una più corretta diagnosi prenatale. In ogni caso è compito del ginecologo/ostetrico informare i genitori che tali metodiche invasive consentono di escludere o confermare un'infezione fetale senza definire il tipo e il grado di danno fetale, se presente, fornendo così un numero maggiore d'informazioni per decidere se interrompere o meno la gravidanza ma non dando una diagnosi certa di infezione congenita da rosolia. A tal scopo un valido aiuto è dato dal periodico monitoraggio ecografico del feto che consente di evidenziare, attraverso una metodica non invasiva e poco costosa, eventuali anomalie dei vari distretti corporei fetali definendo con maggiore accuratezza e precisione

l'entità del danno al prodotto del concepimento. L'indagine ultrasonografica consente infatti di visualizzare:

- anomalie del SNC: microcefalia, meningocele;
- anomalie cranio facciali: cataratta, microftalmia;
- anomalie cardiovascolari: difetto del setto atriale e/o ventricolare, stenosi dell'arteria polmonare;
- anomalie gastro-intestinali: epatomegalia;
- altro: IUGR, splenomegalia, disordini renali e ipospadia.

Al controllo ecografico di 4 delle donne giunte presso il nostro ambulatorio, sono state riscontrate anomalie fetali da infezione congenita. In particolare, in una donna con sieroconversione del I trimestre è stata descritta microcefalia fetale. Difetti del setto interventricolari (DIV) sono stati evidenziati in 2 feti, alle cui madri è stata fatta diagnosi di infezione acuta nell'una e di infezione non escludibile nell'altra. In un feto in cui è stata confermata alla nascita una CRS completa sono state evidenziate nel corso dell'ultimo trimestre, una serie di anomalie quali IUGR, polidramnios, insufficienza atrio-ventricolare, cardiomegalia, idrocele, epatosplenomegalia, ascite, iperecogenicità intestinale e iperplacentosi. Nei primi due casi descritti le madri hanno poi deciso di praticare l'aborto terapeutico. Sarebbe stato utile ottenere i risultati degli esami istologici su placenta di tutte le donne che hanno interrotto la gravidanza per infezione da rosolia per confermare il sospetto dato dal risultato dell'amniocentesi e dell'ecografia. In ogni caso, quest'ultima metodica s'è dimostrata essere utile e affidabile nella valutazione del danno fetale. Tuttavia, anch'essa ha dei limiti: la sordità, che rappresenta la più frequente anomalia della sindrome da rosolia congenita, non è evidenziabile all'indagine ultrasonografica.

Nella parte finale dello studio abbiamo valutato l'outcome neonatale distinguendo tra casi non infetti ed infetti e, tra questi ultimi tra infezioni congenite asintomatiche o CRI e sindromi da rosolia congenita (CRS). Il numero totale d'infetti è pari a 10 bambini: 6 CRI e 4 CRS. Le infezioni da rosolia congenita asintomatica caratterizzano i bambini in cui è possibile il dosaggio della viremia in assenza di

manifestazioni cliniche. Due di questi bambini sono nati da madri in cui l'infezione è stata contratta a 13 settimane di gestazione, due da donne in cui è stata contratta nel corso del II trimestre, uno solo è nato da madre con infezione verso la fine della gravidanza. Tutte le donne considerate hanno manifestato sintomi con un quadro sierologico positivo, rappresentando pertanto casi confermati d'infezione. Anche se i bambini nati da queste donne sono sani, non esistono dati in letteratura che possano escludere l'eventuale insorgenza di manifestazioni cliniche tardive riconducibili ad infezione congenita.

Nel complesso, quattro sono stati i casi di sindrome da rosolia congenita: completa in un caso e incompleta per la presenza della sola sordità in altri due casi, tutti caratterizzati da infezione acuta in gravidanza. Solo una donna con probabile infezione in gravidanza ha partorito un neonato con sospetta sindrome per la presenza contemporanea di un DIV e della pervietà del dotto arterioso di Botallo. Come descritto in letteratura, anche nel nostro studio la sordità è stata l'unica anomalia congenita osservabile in bambini nati da madri che hanno contratto l'infezione dopo le prime 12 settimane di gravidanza. Solo una donna che ha contratto l'infezione da rosolia nel corso dell'11° settimana di gestazione ha partorito un neonato con le caratteristiche cliniche di una sindrome da rosolia congenita per la contemporanea presenza di sordità bilaterale, petecchie, epatosplenomegalia, DIA, PDA e calcificazioni periventricolari. Non abbiamo evidenziato nessun caso di CRS quando l'infezione è stata contratta dopo le 16 settimane di gestazione.

## CONCLUSIONI

Nonostante i programmi di vaccinazione siano stati promossi ed attivati su tutto il territorio Italiano, ancora troppo forte è l' impatto sociale dell' infezione congenita da rosolia. Basti pensare che solo nel nostro Centro di Riferimento per Malattie Infettive in Campania, sono stati diagnosticati 10 casi certi di infezione congenita da rosolia dal 2000 ad oggi.

Lo screening pre-concezionale e l'immunità delle donne gravide sono ancora inadeguate in Italia e nel resto d'Europa. I paesi Europei dovrebbero sostenere le strategie comuni per migliorare il più possibile l'impatto delle raccomandazioni per la prevenzione della rosolia in gravidanza. Questo è possibile solo attraverso la coordinazione e integrazione di varie attività e differenti attori che dovrebbero partecipare all'obiettivo finale di prevenire i casi di questa malattia. A tal fine sono fondamentali: l'azione sinergica di tutte le componenti dell'assistenza sanitaria e sociale variamente coinvolte (ospedale, territorio, pediatri, ginecologi, ostetriche, scuole, volontariato, ecc.), la predisposizione di materiale informativo e la diffusione di messaggi promozionali attraverso i mezzi di comunicazione, il miglioramento del sistema di sorveglianza degli eventi avversi ai vaccini e l'identificazione di una commissione nazionale per la loro valutazione ed infine un coordinamento nazionale che garantisca un'azione di indirizzo e sostegno a tutte le regioni.

## BIBLIOGRAFIA

Weiss ME. The fourth disease, 1900–2000. *Lancet* 2001;357:299–301.

Hess AF. German measles (rubella): an experimental study. *Arch Intern Med, Chicago* 1914;13:913–6.

Gregg NmcA. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 1941;3:35–46.

Centers for Disease Control and Prevention: Pink's book chapter on rubella.

Epidemiology & Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 2008

Jennifer M. Best. Rubella. *King's College London School of Medicine, Department of Infection, St Thomas' Hospital, London SE1 7EH, UK. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* (2007) 12, 182e192.

Armstrong N, O'Donnell N. Anniversary of rubella epidemic. *Lancet* 2004;364(9431):328.

M. De Santis et al. Rubella infection in pregnancy. *Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University of Sacred Heart, Rome, Italy. Reproductive Toxicology* 21 (2006) 390–398.

World Health Organisation. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Wkl Epidemiol Rec* 2005;80:125e32.

Frey TK et al. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961–1997. *J Infect Dis* 1998;178:642–50.

Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. *Lancet* 2004;363:1127e37.

Gabutti G et al. Serological study group. Epidemiology of measles, mumps and rubella in Italy. *Epidemiol Infect* 2002;129(3):543–50.

Ciofi Degli Atti ML et al. Pediatric sentinel surveillance study group. Pediatric sentinel surveillance of vaccine-preventable diseases in Italy. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(8):763–8.

Robert S. Duszak, O. D. Philadelphia Veterans Affairs Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania. Congenital rubella syndrome – major review. *Optometry* 2009;80:36-43.

Swan Cet al. Final observations on congenital defects in infants following infectious diseases during pregnancy, with special reference to rubella. *Med J Aust* 1946;2(26): 889-909.

O'Neill JF. The ocular manifestations of congenital infection: a study of the early effect and long-term outcome of maternally transmitted rubella and toxoplasmosis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998;96:813-79.

Freij BJ, Sever JL. Chronic infections. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, eds. Neonatology: pathophysiology and management of the newborn. *Philadelphia: Lippincott; 1994:1029-82.*

Alford CA, Pass RF. Epidemiology of chronic congenital and perinatal infections of man. *Clin Perinatol* 1981;8:397.

Harley RD. Discussion comments. In: Boniuk V, Bouiuk M, eds. The prevalence of phthisis bulbi as a complication of cataract surgery in the congenital rubella syndrome. *Trans Am Aca Ophthlmol Otol* 1970;74:360-8.

Sever JL et al. Rubella epidemic, 1964: effect on 6,000 pregnancies. *Am J Dis Child* 1965;110(10):395-407.

Cooper LZ et al. In: Remington JS, Klein JO, eds. Infectious disease of the fetus and newborn infant. *Philadelphia:Saunders; 1995:268-311.*

South MA, Sever JL. Teratogen update: the congenital rubella syndrome. *Teratology* 1985;31:297-307.

Lindegren ML et al. Update: rubella and congenital rubella syndrome, 1980-1990. *Epidemiol Rev* 1991;13:341-8.

Miller E. Rubella in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 1991;107:31-42.

Karakoc GB et al. Seroprevalence of rubella in schoolgirls and pregnant women. *Eur J Epidemiol* 2003;18:81-4.

Centers for Disease Control and Prevention. Rubella and congenital rubella syndrome-United States, 1994-1997. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep* 1997;46:350-4.

Centers for Disease Control and Prevention. Control and prevention of rubella: evaluation and management of suspected outbreaks, rubella in pregnant women, and surveillance for congenital rubella syndrome. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep* 2001;50:1-23.

Cutts RF et al. Control of rubella syndrome in developing countries, part 2: Burden of disease from CRS. *Bull World Health Organ* 1997;75:55-80.

Grillner L et al. Outcome of rubella during pregnancy with special reference to the 17th-24th weeks of gestation. *Scand J Infect Dis* 1983;15:321-5.

Miller E et al. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet* 1982;2:781.

Webster WS. Teratogen update: Congenital rubella. *Teratology* 1998;58:13-23.

Menser MA, Reye RK. The pathology of congenital rubella: A review written by request. *Pathology* 1974;6:215-22.

Burgess MA. Rubella reinfection: *What risk to the fetus?* *Med J Aust* 1992;156:824-5.

Miller E. Rubella reinfection. *Arch Dis Child* 1990;65:820-1.

Givens KT et al. Congenital rubella syndrome: ophthalmic manifestations and associated systemic disorders. *Br J Ophthalmol* 1993;77:358-63.

McIntosh ED, Menser MA. A fifty year follow up of congenital rubella. *Lancet* 1992;340:414-5.

Sever JL et al. Delayed manifestations of congenital rubella. *Rev Infect Dis* 1985;7:164-9.

Hanna C. Embryonic time table of cataract formation in congenital rubella. *J Pediatr Ophthalmol* 1976;13:266-73.

Arnold JJ et al. A fifty year follow up of ocular defects in congenital rubella: Late ocular manifestations. *Aust NZ J Ophthalmol* 1994;22:1-6.

Armstrong N. The ocular manifestations of congenital rubella syndrome. *J Am Soc Ophthalmic Reg Nurs* 1992;1:14-6.

Revello MG et al. Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35:708–713.

Julian W. Tang et al. Prenatal diagnosis of congenital rubella infection in the second trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2003; 23: 509–512.

Muriel Mace' et al. Diagnostic Value of Reverse Transcription-PCR of Amniotic Fluid for Prenatal Diagnosis of Congenital Rubella Infection in Pregnant Women with Confirmed Primary Rubella Infection. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Oct. 2004, p. 4818–4820.

Centers for Disease Control and Prevention. Rubella. Manual for the surveillance of Vaccine-Preventable Diseases. 2008

SOGC Clinical Practice Guidelines. Rubella in pregnancy. *N.ro 203, February 2008*.

Degani S. Sonographic findings in fetal viral infections: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2006 May;61(5):329-36.

Blenda Bottiger , Inge Panum Jensen. Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection. *Clinical and Diagnostic Virology* 8 (1997) 105–111.

J E Banatvala, D W G Brown. Rubella. *Lancet* 2004; 363: 1127–37.

Ella Mendelson et al. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reproductive Toxicology* 21 (2006) 350–382.

C. Vauloup-Fellous and L. Grangeot-Keros. Humoral Immune Response after Primary Rubella Virus Infection and after Vaccination. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, May 2007, p. 644–647.

Xiomara Badilla et al. Fetal Risk Associated With Rubella Vaccination During Pregnancy. *The Pediatric Infectious Disease Journal* Volume 26, Number 9, September 2007.



Dorota Mroz'ek-Budzyn et al. Lack of Association Between Measles-Mumps-Rubella Vaccination and Autism in Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* Volume 29, Number 5, May 2010.

Soju Chang et al. Elective termination of pregnancy after vaccination reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS): 1990—2006. *Vaccine* (2008) 26, 2428—2432.

*BEN – Notiziario ISS- Vol. 16 – n. 5.*

*BEN - Notiziario ISS- Volume 22 - numero 2.*

## Prenatal diagnosis of congenital rubella infection and ultrasonography: a preliminary study

A. MIGLIUCCI<sup>1</sup>, D. DI FRAJA<sup>1</sup>, L. SARNO<sup>1</sup>, E. ACAMPORA<sup>1</sup>, L. L. MAZZARELLI<sup>1</sup>,  
F. QUAGLIA<sup>1</sup>, G. MALLIA MILANES<sup>1</sup>, W. BUFFOLANO<sup>2</sup>, R. NAPOLITANO<sup>1</sup>,  
S. SIMIOLI<sup>1</sup>, G. M. MARUOTTI<sup>1</sup>, P. MARTINELLI<sup>1</sup>

**Aim.** The aim of this study was to analyze the role of ultrasonography in the prenatal diagnosis of women with confirmed rubella infection in pregnancy.

**Methods.** We performed a retrospective, population-based study on 175 women referred to our Centre of Infectious Disease in Pregnancy of AOU Federico II for rubella infection, in the period between January 1999 and December 2009. In confirmed cases of infection we performed periodic ultrasonographic assessment of fetal anatomy looking for prenatal findings of rubeovirus infection. Neonatal outcomes were collected.

**Results.** Among 175 women, 48 (27.4%) were confirmed cases, in 83 (47.4%) cases rubella infection remain suspected. The remaining 44 (25.1%) women were excluded to having rubella infection in pregnancy. No defined probable cases were found. Among children born to mother with confirmed rubella infection, 9 (18.7%) resulted infected by rubella virus. In particular 6 newborns (66% of the affected) were asymptomatic; two babies showed incomplete congenital rubella syndrome (CRS), due to the presence of deafness in the absence of other congenital abnormalities without showing any USG findings. Only one baby showed a complete CRS: USG pre-

<sup>1</sup>Prenatal Diagnosis Unit  
Department of Obstetrics and Gynecology  
University Hospital Federico II, Naples, Italy  
<sup>2</sup>Department of Paediatrics  
University Hospital Federico II, Naples, Italy

natal rubella infection findings were IUGR, polydramnios, cardiomegaly, defects of atrial septum, hepatosplenomegaly, ascites, echogenic bowel, placentomegaly. USG specificity and sensitivity was 100% and 11% respectively.

**Conclusion.** USG has an important role in the detection rubella intrauterine infection in case of severe abnormalities. The obstetricians should understand the limitations of ultrasound in detection of deafness and minor abnormalities.

**Key words:** Prenatal diagnosis - Pregnancy - Rubella syndrome, congenital - Ultrasonography.

Rubella is a viral infection widespread all over the world and associated with a high risk of severe fetal anomalies in pregnancy, particularly in the first 12 weeks of gestation. The abnormalities caused by congenital rubella infection are collectively known as congenital rubella syndrome (CRS). The classic abnormalities are cataracts, heart defects and sensorineural deafness, but many other abnormalities may be found.<sup>1</sup> The main source of infection are children affected, who are able to eliminate

**Acknowledgement.**—We would like to thank all the members of the pediatric department helping in the collection of the data.

Received on April 7, 2011.

Accepted for publication on October 11, 2011.

Corresponding author: A. Migliucci, Prenatal Diagnosis Unit, Department of Gynecology and Obstetrics, University AOU "Federico II", S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy.  
E-mail: annalisa.migliucci@gmail.com

rubella virus for a period of 12 months.<sup>2</sup> The risks of fetal rubella infection and malformations are related to mother's infection gestational age. Fetal infection rate decreases from about 80% in the first 10 weeks to 54% at 13-14 weeks, without any CRS described in case of maternal infection after 16 weeks of gestation.<sup>3, 4</sup> Fetus damage is restricted to deafness when mother's rubella infection is contracted after the first 12 weeks of gestation.<sup>5</sup>

Ultrasonography (USG) has been reported to be a low sensitive tool for prenatal diagnosis, especially for the asymptomatic cases because many fetuses with rubella embryopathy do not show clear USG signs; when these signs are present, fetal abnormality is almost certain.<sup>1, 2</sup>

The aim of this study was to analyze the role of USG in prenatal diagnosis of CRS.

### Materials and methods

In the observational period between January 1999 and December 2009, 175 women for rubella infection in pregnancy were referred to the Centre of Infectious Diseases in Pregnancy, University of Naples "Federico II". Historical and laboratory data were collected.

Acute rubella infection in pregnancy was defined as confirmed, probable, suspected or excluded, according with the Centers for Disease Control and Prevention classification.<sup>6</sup> A confirmed infection could be ascertained if it met anyone of the following clinical criteria: 1) acute onset of generalized maculopapular rash; 2) a temperature higher than 99 °F (37.2 °C), if measured; and 3) arthralgia or arthritis, lymphadenopathy, or conjunctivitis, if the serum evidence revealed a seroconversion and/or the detection of rubella virus specific IgM and rubella virus-specific low-avidity IgG. A probable infection was defined if meet the clinical case definition without serologic test results. A suspected infection was

were present. Acute infection was excluded if serological evidence indicated an absent or a previous infection.<sup>6</sup>

The gestational age at maternal infection was calculated as weeks between last menstrual period and rash; for women previously exposed to a confirmed case of rubella infection, it was calculated adding to the day of exposition two weeks.<sup>1, 6</sup>

In women with confirmed rubella infection in pregnancy we performed periodic ultrasonographic assessment of fetal anatomy looking for prenatal signs of rubella virus infection, such as: cataracts, microphthalmia, microcephaly, congenital heart diseases, hepatosplenomegaly and intrauterine growth restriction (IGR).<sup>7</sup> Neonatal outcomes were collected if women had a confirmed rubella infection in pregnancy, by telephonic interviews and analysis from the Department of Paediatrics Infections database, University of Naples "Federico II".

### Results

Among 175 women referred, 48 (27.4%) were confirmed cases, 83 (47.4%) were suspected. The remaining 44 (25.1%) women were excluded to having rubella infection in pregnancy. No probable cases were identified (Table I).

A further analysis of the confirmed cases follows. As regards the gestational age, 24

TABLE I.—Classification of cases of rubella infection in pregnancy.

Cases	Number (%)
Confirmed	48 (27.4)
Symptomatic	35 (72.9)
Rash	13 (37.1)
Fever	10 (28.1)
Lynpho.	8 (22.8)
Arthr	4 (11.4)
Asymptomatic	13 (27)
Suspected	83 (47.4)
Persistence of low-titre of IgM	38 (45.8)

if rash appears in	first trimester clin. And ser. data	43 (58.3)
IgM and rubella	Probable	0 (0)
to high avidity	Excluded	14 (25.1)

considered if any generalized acute onset or low-titre of virus positive test associated

TABLE II.—Description of symptomatic babies affected by congenital rubella syndrome (CRS).

CRS	Clinical manifestations	Prenatal USG findings	GA at maternal infection*	Time of USG findings*
1	Unilateral deafness	—	15-16	—
2	Bilateral deafness	—	15-16	—
3	Bilateral deafness, purpura, hepatosplenomegaly, ascites, patent ductus arteriosus	Cardiomegaly, defects of atrial septum, cerebral periventricular calcifications, ascites, hepatosplenomegaly, echogenic bowel, IUGR, polydramnios, placentomegaly	11	20

\*the time is referred to weeks of gestation

(50%) women contracted viral infection in the first trimester; 4 (16.6%) of these were reinfections in women previously vaccinated against rubella virus. Rubella infection was contracted during the second trimester in 16 (33.3%) women, only in one (2%) case the infection occurred in the III trimester of pregnancy. In 7 (14.5%) cases it was not possible to calculate the maternal gestational age at the time of infection. Nine mothers (18.75%) terminated the pregnancy. Among children born from mothers with confirmed rubella infection in pregnancy, 9 (18.7%) newborns resulted infected because of the positivity of serological pattern in absence of symptoms (6, 66.6%) or manifest CRS (3, 33.3%) (Table II).

All mothers showed seroconversion serology pattern. The overall risk of infection was 18.7%. Two babies (67%) showed incomplete congenital rubella syndrome (CRS), due to the presence of deafness in the absence of other congenital abnormalities without showing any USG findings. Only one baby (33%) showed a complete CRS for the manifestation at birth of purpura, hepatosplenomegaly, ascites, patent ductus arteriosus, defects of atrial septum, asymptomatic periventricular cerebral calcifications and bilateral deafness; USG prenatal rubella infection findings were IUGR, polydramnios, cardiomegaly, defects of atrial septum, cerebral calcifications, hepatosplenomegaly, ascites, echogenic bowel, placentomegaly. Ultrasonography specificity and sensitivity was 100% and 11% respectively.

### Discussion

Rubella is a human disease associated with a 90% risk of congenital abnormalities if acquired in the first 12 weeks of pregnancy. Reinfection in early pregnancy is usually subclinical and it presents a much smaller risk (5-8%).<sup>8</sup>

Congenital rubella is a progressive disease that can affect virtually all organ systems. Deafness is the most common and often the unique manifestation of congenital rubella infection, especially after the fourth month of gestation. Eye, cardiac, neurologic defects and other abnormalities, including bone lesions, splenomegaly, hepatitis, and thrombocytopenia with purpura may occur.<sup>9</sup>

The highest prenatal detection rate is based on RT-PCR of rubella virus RNA in amniotic fluid samples. Specificity of RT-PCR is 100% and sensitivity is between 83% and 95%.<sup>10, 11</sup>

Ultrasonographic is a not invasive and economic procedure that may be useful to detect the severity of fetal damage by the identification of rubella-virus USG fetal findings, such as:

- neurological abnormalities: microcephaly, hydrocephalus;
- eyes abnormalities: microphthalmia and cataracts;
- cardiovascular abnormalities: ventricular or atrial septum defects, pulmonary stenosis;
- gastrointestinal abnormalities: hepatomegaly, ascites, echogenic bowel;



— Other: IUGR, splenomegaly, polydramnios, kidney disorders, hypospadias and placentomegaly.<sup>6,7</sup>

In our series all the affected babies came from mothers with seroconversion in pregnancy, confirming the low rate of vertical transmission in case of probable and not clinical and serological confirmed infection.<sup>6,9</sup>

USG is confirmed to have a low sensitivity in detecting asymptomatic affected fetuses.<sup>1,2</sup> In case of symptomatic fetuses, one out of three newborns showed signs of infection prenatally. Interestingly, the remaining two reported only hearing defects, impossible to diagnose prenatally.

The limitation of USG remains associated with the false negative results of hearing abnormalities, the most frequent congenital defects.<sup>7</sup>

All infected babies showed deafness at birth, this was the only clinical symptom in two of them, born from mothers with a 15-16 weeks rubella infection. Only one newborn showed several congenital defects. The infection in the mother was at 11 weeks, confirming the high risk of fetal infection in the first trimester of pregnancy.

Deafness and cardiac congenital defects are reported in 85% of children born to mother with confirmed infection in the first 12 weeks, and the isolated deafness as congenital rubella abnormality in 35% of children with a time of infection at 13-16 weeks of gestation.<sup>12,13,14</sup> Our data confirmed the previous reported in literature.

### Conclusions

No cases of affected newborns are reported without a maternal seroconversion in pregnancy. USG has an important role in the detection rubella intrauterine infection in case of severe abnormalities. The obstetricians should understand the limitations of ultrasound in detection of deafness and minor abnormalities. Women can be reassured on relatively good outcome in case of normal USG. The impossibility of a prenatal diagnosis of fetal deafness remains an un-

resolved problem and should be taken in account in the counseling.<sup>7</sup>

### Riassunto

*Diagnosi prenatale di rosolia congenita ed ecografia: uno studio preliminare*

**Obiettivo.** Dimostrare il ruolo dell'ultrasonografia nella diagnosi prenatale di rosolia congenita.

**Metodi.** Studio descrittivo retrospettivo. 175 donne giunte presso il nostro centro per sospetta infezione da rosolia in gravidanza, nel periodo compreso tra Gennaio 1999 e Dicembre 2009. Nei casi di infezione confermata sono stati eseguiti controlli ecografici seriati alla ricerca di segni di infezione. Si riporta l'outcome neonatale.

**Risultati.** Su 175 donne studiate, 48 (27,4%) sono state classificate come casi confermati, 83 (47,4%) sono state classificate come casi sospetti, 44 (25,1%) erano donne in cui era esclusa con certezza l'infezione; non sono stati diagnosticati casi di infezione probabile. Nove (18,7%) bambini nati da donne con infezione confermata erano infetti. In particolare, 6 neonati (66,6%) erano asintomatici, altri 2 presentavano una forma incompleta di sindrome da rosolia congenita (CRS) per la sola presenza di sordità in assenza di ulteriori difetti congeniti, senza mostrare alcun segno ecografico prenatale di infezione. Solo un neonato presentava una CRS completa: i segni ecografici di infezione erano ritardo di crescita, polydramnios, cardiomegalia, difetti del setto atriale, epatosplenomegalia, ascite, ipercogenicità intestinale e placentomegalia. La specificità e la sensibilità dell'USG sono state 100% e 11% rispettivamente.

**Conclusione.** L'ultrasonografia ha un ruolo fondamentale nel management della rosolia in gravidanza nei casi di severi difetti congeniti. I ginecologi dovrebbero comprendere i limiti di tale metodica nell'individuazione della sordità e dei difetti minori.

Parole chiave: Diagnosi prenatale - Gravidanza - Rosolia congenita, sindrome - Ultrasonografia.

### References

1. Best JM. Rubella. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:182-92.
2. De Santis M, Cavaliere AF, Straface G, Caruso A. Rubella infection in pregnancy. *Reprod Toxicol* 2006;21:390-8.
3. Miller E. Rubella in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 1991;107:31-42.
4. Grillner L, Forsgren M, Barr B, Böttiger M, Danielsson L, De Verdier C. Outcome of rubella during pregnancy with special reference to the 17th-24th weeks of gestation. *Scand J Infect Dis* 1983;15:321-5.
5. Miller E, Craddock-Watson JE, Pollock TM. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet* 1982;2:781-4.
6. CDC. The Pink Book: Chapter 18. Rubella. The epidemiology and prevention of vaccine preventable diseases.

7. Degani S. Sonographic findings in fetal viral infections: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2006;61:329-36.
8. Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. *Lancet* 2004;363: 1127-37.
9. Duszak RS. Congenital rubella syndrome – major review. *Optometry* 2009;80:36-43.
10. Macé M, Cointe D, Six C, Levy-Bruhl D, Parent du Châtelet I, Ingrand D *et al*. Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4818-20.
11. Revello M.G, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Torsellini M, Gerna G. Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:708-13.
12. Miller E. Rubella in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 1991;107:31-42.
13. Grillner L, Forsgren M, Barr B, Böttiger M, Danielsson L, De Verdier C. Outcome of rubella during pregnancy with special reference to the 17th-24th weeks of gestation. *Scand J Infect Dis* 1983;15:321-5.
14. Miller E, Cradock-Watson JE, Pollock TM. Consequences of confirmed maternal rubella at successive

MINERVA MEDICA  
COPYRIGHT®



# LA DONNA

IL FASCINO DELLA GINECOLOGIA  
MODERNA TRA SALUTE E  
SICUREZZA DELLA DONNA:  
AGGIORNAMENTI E NECESSITÀ

MONTECATINI TERME  
12 - 13 - 14 APRILE 2012

PALAZZO DEI CONGRESSI  
DI MONTECATINI TERME



3° CONGRESSO NAZIONALE FIG



2° CONGRESSO NAZIONALE AGIF



CONGRESSO STRAORDINARIO AGUI



17° CONGRESSO NAZIONALE AGICO



14° CONGRESSO NAZIONALE AGEO

ATTI

### P3.25

#### - DIAGNOSI ECOGRAFICA E MANAGEMENT DI CISTI OVARICA FETALE -

ESPOSITO GIUSEPPINA<sup>[1]</sup>, TESSITORE GIOVANNI<sup>[1]</sup>, VOLO MONICA<sup>[1]</sup>, DONADONO VERA<sup>[1]</sup>, SIRICO ANGELO<sup>[1]</sup>, SAVIANO ROSA<sup>[1]</sup>, FERRILLO GRAZIA<sup>[1]</sup>, DI CRESCIE MARCO<sup>[1]</sup>, CAPONE ANGELA<sup>[1]</sup>, SIMIOLI STEFANIA<sup>[1]</sup>, QUAGLIA FILOMENA<sup>[1]</sup>, MARUOTTI GIUSEPPE MARIA<sup>[1]</sup>, MARTINELLI PASQUALE<sup>[1]</sup>

- <sup>[1]</sup>AOU FEDERICO II, AREA FUNZIONALE DI EMERGENZE OSTETRICHE E GINECOLOGICHE ~ NAPOLI

*Il riscontro di una massa intra-addominale in un feto di sesso femminile deve fare ipotizzare una cisti ovarica; solitamente si tratta di cisti disfunzionali (follicolari o luteiniche. L'intensa produzione ormonale placentare e materna può agire sui normali follicoli ovarici stimolandoli.*

*Una paziente di 28 anni I gravida nel corso della 34a settimana di amenorrea è stata indirizzata al nostro ambulatorio di Diagnosi Prenatale per la valutazione di una massa addominale fetale.*

*L'ecografia ha evidenziato in un feto di sesso femminile una tumefazione pelvica. Il feto presentava una biometria lievemente aumentata rispetto all'epoca gestazionale, liquido amniotico e placenta regolari. A livello addominale è stata riscontrata pielectasia renale bilaterale con valori massimi di 7mm a destra e 6.4mm a sinistra, assenza di caliectasia. Nella pelvi fetale, in regione sinistra, accanto a regolare vescica, si è osservata una massa grossolanamente circolare di circa 51x39mm negativa al color Doppler con componente anecogena centrale con grossolani echi al suo interno di 26.3x35.5mm. Dal momento che la massa non ha rapporti con i reni, si osserva una regolare vescica, si ipotizza possa essere una cisti ovarica. In una successiva valutazione eseguita nel corso della 37a settimana il reperto risultava invariato.*

*Dopo la nascita la neonata è stata sottoposta ad ecografia pelvica che confermava la presenza di cisti ovarica sinistra, non regredita spontaneamente, ed è stata operata per via laparoscopica a tre mesi di vita. La massa è stata completamente rimossa salvaguardando la gonade, ed è stata quindi indirizzata all'esame istologico (cisti disontogenetica).*

*In letteratura sono riportati oltre 100 casi di cisti ovarica fetale. La diagnosi è di sospetto, eseguita quasi sempre nel corso del III trimestre. Sono pazienti a maggior rischio le pazienti diabetiche con iperplacentosi, ipertiroidie, ipertensione indotta dalla gravidanza, immunizzazione Rh (per aumento dei livelli di beta hCG). Le cisti fetali si presentano come formazioni anecogene o settate che devono essere distinte dalla vescica o dai reni; impossibile la diagnosi differenziale con le anomalie cistiche derivanti dal tratto gastrointestinale.*

*Dopo il parto le cisti tendono a risolversi spontaneamente grazie alla riduzione della stimolazione ormonale; può essere necessario un intervento in caso di complicanze maggiori quali torsione, emorragia o rottura, complicanze che, seppur rare, potrebbero richiedere la rimozione della gonade con conseguenti possibili rischi per il futuro riproduttivo.*





### P3.24

#### - IDROPE FETALE: ESPERIENZA ANNUALE DEL NOSTRO CENTRO. -

ESPOSITO GIUSEPPINA<sup>[1]</sup>, DONADONO VERA<sup>[2]</sup>, SIRICO ANGELO<sup>[3]</sup>, SAVANO ROSA<sup>[4]</sup>, CELOTTO SABRINA M<sup>[1]</sup>, DI CRESCE MARCO<sup>[1]</sup>, SIMIOLI STEFANIA<sup>[5]</sup>, MALLIA MILANES GIOVANNA<sup>[1]</sup>, MORLANDO MADDALENA<sup>[1]</sup>, SARNO LAURA<sup>[6]</sup>, MIGLIUCCI ANNALISA<sup>[7]</sup>, MAZZARELLI LAURA LETIZIA<sup>[1]</sup>, MARUOTTI GIUSEPPE MARIA<sup>[1]</sup>, MARTINELLI PASQUALE<sup>[7]</sup>

-<sup>[1]</sup>AOU FEDERICO II AREA FUNZIONALE DI EMERGENZE OSTETRICHE E GINECOLOGICHE ~ NAPOLI

*Riportare le caratteristiche ultrasonografiche e l'eziologia dei casi di idrope fetale venuti alla nostra osservazione in un anno.*

Sono stati investigati 5 casi di idrope fetale in cui è stata eseguita anche valutazione della flussimetria dei distretti cerebrali e del dotto venoso per il riscontro di eventuale anemia e scompenso cardiaco. L'anamnesi delle pazienti è stata eseguita molto accuratamente ed è stata volta a valutare la possibile eziologia: l'esistenza di un rischio relativo ad alcune malattie ereditarie, la presenza di un'infezione in atto, l'utilizzo di farmaci che possano determinare anemia fetale, il verificarsi di un'isoimmunizzazione materna. La diagnosi iniziale di idrope viene sempre effettuata ecograficamente ed è posta nel terzo trimestre in oltre il 50% dei casi. I segni ecografici sono l'ascite, l'idrotorace, l'effusione pericardica, l'edema sottocutaneo, il poliamnios. Le cause dei 5 casi di idrope fetale analizzati sono state rispettivamente: 1 infezione accertata da Parvovirus B19, 1 cromosomopatia, 3 sindromi genetiche.

L'idrope è un accumulo eccessivo di liquido nel corpo fetale, nei tessuti o nelle cavità sierose, per essere definita idrope è necessario che almeno due distretti fetali siano interessati.

Se ne distinguono due forme: immune e non immune: l'idrope immune è dovuta alla presenza di anticorpi circolanti materni contro antigeni eritrocitari fetali con emolisi e conseguente anemia, l'idrope non immune è una complicazione relativa a patologie malformative che possono essere determinate da alterazioni genetiche o infettive.

La valutazione anamnestica deve essere approfondita e deve comprendere l'anamnesi familiare e farmacologica, il riscontro di eventuali infezioni o di un'isoimmunizzazione materna. La prognosi dell'idrope non immune è scadente. La percentuale globale di sopravvivenza dei feti affetti da isoimmunizzazione Rh supera il 90%.

## MANAGEMENT DELLE GRAVIDANZE “AD ALTO RISCHIO”

Negli ultimi decenni la scienza biomedica e la pratica clinica hanno modificato in maniera sostanziale le caratteristiche fisiologiche delle donne in età riproduttiva.

I cambiamenti dello stile di vita, il controllo della riproduzione, l'aumento della sopravvivenza e della fertilità delle donne con gravi malattie croniche, il riconoscimento di fattori di rischio ereditari ed acquisiti non letali e/o curabili e le tecniche di riproduzione assistita hanno incrementato il numero di gravidanze “ad alto rischio”.

Fino ad alcuni anni fa condizioni materne preesistenti come l'obesità, il diabete mellito, le endocrinopatie, le malattie renali, le cardiomiopatie, le emoglobinopatie, le malattie neurovegetative, le infezioni, il trapianto d'organo ed il cancro rendevano impensabile una gravidanza. Le tecniche di riproduzione assistita hanno inoltre introdotto gravidanze in epoca post-menopausale ed aumentato l'incidenza di gravidanze multiple. Tutti questi fattori hanno contribuito a trasformare l'epidemiologia della morbosità e della mortalità materne. L'impatto del progresso medico può essere rilevato dalle casistiche dei CDC (Centers for Disease Control and Prevention) sulla mortalità materna ricavate dai certificati di morte. Tra le principali cause di morte legate alla gravidanza, oltre alla ben nota triade embolia (20%), emorragia (17%) e malattie ipertensive della gravidanza (16%), il CDC riporta che il 19% delle morti materne è dato da “altre condizioni mediche”. Tale categoria è rappresentata proprio da tutte quelle condizioni cliniche preesistenti alla gravidanza che influenzano l'outcome materno nonché fetale della gravidanza stessa.

Una gravidanza che coesiste o s'impone su una malattia materna preesistente è pertanto considerata una gravidanza “ad alto rischio” e richiede il coinvolgimento di molteplici figure professionali mediche che si affiancano al ginecologo/ostetrico durante tutto il decorso della gravidanza, al fine di garantire il successo della stessa. Fondamentale è anche il counseling pre-concezionale multidisciplinare che deve avere come obiettivo quello di informare la paziente sui rischi materni e fetali legati

all'instaurarsi di una gravidanza e di garantire che la paziente arrivi al momento del concepimento nelle migliori condizioni cliniche possibili.





Case Report

## Anesthetic management of a parturient with spinal muscular atrophy type II

Giuseppe Maria Maruotti PhD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Rita Anfora MD (Staff Anesthesiologist)<sup>b</sup>,  
Emilio Scanni MD (Assistant Professor of Anesthesia)<sup>b</sup>,  
Marco Rispoli MD (Staff Anesthesiologist)<sup>b</sup>,  
Laura Letizia Mazzarelli PhD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Raffaele Napolitano MD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Maddalena Morlando MD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Laura Sarno MD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Giovanna Mallia Milanes MD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Stefania Simioli MD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Annalisa Migliucci MD (Staff, Gynecology Obstetrics)<sup>a</sup>,  
Pasquale Martinelli MD (Professor of Gynecology Obstetrics)<sup>a,\*</sup>,  
Pasquale Mastronardi MD (Professor of Anesthesia)<sup>b</sup>

<sup>a</sup>High-Risk Pregnancy Center, Department of Gynaecology and Obstetrics, University Federico II, 80100 Naples, Italy

<sup>b</sup>Department of Anaesthesiology, University Federico II, 80100 Naples, Italy

Received 27 November 2010; revised 28 January 2012; accepted 5 March 2012

### Keywords:

Cesarean section;  
Obstetric anesthesia;  
Spinal muscular atrophy;  
Delivery pregnancy;  
Subarachnoid anesthesia

**Abstract** In the past, pregnancy was contraindicated in patients with spinal muscular atrophy. Recently, more cases are occurring because of improvement in survival and functional status. The goals for anesthetic management of these patients include satisfactory anesthesia during surgery and excellent postoperative analgesia with minimal compromise of respiratory function. Spinal anesthesia may be considered contraindicated due to spinal deformities, but successful spinal anesthesia was performed in a 37 year old parturient following magnetic resonance imaging of the spine.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Spinal muscular atrophies (SMAs) are a heterogeneous group of neuromuscular pathologies characterized by primary degeneration of motor neurons of the anterior horns of the spinal cord. Spinal muscular atrophies are the

\* Correspondence: Pasquale Martinelli, MD, Vico Acitillo 53, 80131 Naples, Italy. Tel.: +39 81 746-2966; fax: +39 81 746-2966.  
E-mail address: martinelli@unina.it (P. Martinelli).

second most common group of autosomal recessive diseases after cystic fibrosis, with a prevalence of 1/6,000 newborns [1]. Almost 98% of clinical cases are caused by the homozygous absence of a region of exons 7 and 8 of the telomeric copy of the SMN gene (SMN1) on chromosome 5 [2].

The International SMA Consortium [3] and the European Neuromuscular Centre (ENMC) [3] have identified 5 types of SMA, which are classified by age of onset and death, and achievement of motor milestones:

- Type I (Werdnig-Hoffmann syndrome) is diagnosed between birth and 6 months of life. Patients never achieve the ability to sit and death occurs at about two years of life.
- Type II (Infantile Chronic SMA, Intermediate SMA) is diagnosed before 18 months of life. These patients are able to sit, but are unable to stand or walk, and death occurs after two years of life.
- Type III (Kugelberg-Welander Disease) is diagnosed during childhood or adolescence; death occurs during adulthood.
- Type IV (adult SMA) is diagnosed at about 30 years of age. It slowly and progressively damages the bulbar, swallowing, and respiratory muscles and it has a dominant autosomal transmission.
- X-linked SMA (Kennedy Syndrome or bulbar spinal muscular atrophy).

Pregnancy in women affected by SMA II has been reported [4–12]. Women affected by SMA frequently choose not to have children due to the potential pregnancy and SMA-related risks.

## 2. Case report

A 37 year old Caucasian, nulliparous, ASA physical status 3 woman, affected by SMA Type II, was referred to the Department of Gynaecology and Obstetrics at the University of Naples Federico II during the seventh week of gestation. Since her first visit, the patient had emphasized her strong desire and determination to become a mother. The diagnosis of SMA was established at 13 months of life by a clinical electrophysiological test, and histopathological features were present after a muscle biopsy. She has never walked and has been wheelchair-bound since age 6 years. She developed severe scoliosis and joint contractures at 14 years. Her family history included one brother who was affected by SMA, while both her parents were unaffected.

The physical examination showed reduced left bicep mobility associated with distal hyposthenia; the patient was able to flex but not to extend the left hand. The right upper forearm could be flexed against slight resistance, and the right hand could be flexed and extended. The lower limbs were much more compromised; examination showed

declining trophism and proximal muscular plegia. Both plantar fingers and dorsal feet flexion were preserved; the patient has always been immobilized in a wheelchair. Osteotendon reflexes were absent bilaterally. Superficial and deep sensitivity were normal. The patient stated that she occasionally experienced dysphagia with solids. The thorax was affected due to right convex lumbar scoliosis. Her pulmonary status was worsened due to 19 years of smoking, stopped only because of recurrent bronchitis.

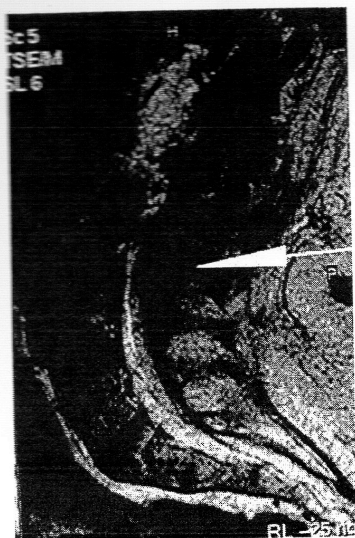
According to genetic counseling, the risk for the couple to have an affected child was about 1% starting from a population carrier risk of one in 40 to one in 80. Invasive prenatal diagnosis for SMA and fetal karyotype were performed on the seventeenth week of gestation by amniocentesis, resulting in a normal karyotype (46 XY chromosomes) without SMA. The clinical and ultrasonographic pattern was normal until the 31st week of gestation. At this time, the patient experienced dyspnea and severe obstructive-restrictive disease with a reduction in functional residual capacity, as shown on spirometry. A cesarean section with spinal anesthesia was scheduled.

### 2.1. Perioperative approach

Corticosteroid prophylaxis for respiratory distress syndrome (RDS) and low-molecular-weight heparin for deep vein thrombosis prophylaxis were administered. Preoperative pulse oximetry showed 93% oxygen saturation ( $SpO_2$ ). Spirometry values showed a typical severe restrictive ventilatory capacity pattern: forced expiratory volume in one second ( $FEV_1$ ) 40%; forced vital capacity (FVC) 35%;  $FEV_1/FVC$  85%. Preoperative blood gas results were pH 7.45;  $pCO_2$  46 mmHg;  $pO_2$  61 mmHg; base excess (BE) 6.6;  $HCO_3^-$  30.5 mEq/L; and  $SpO_2$  96%. The patient underwent preoperative continuous positive airway pressure (CPAP) with a face mask (inspired oxygen concentration 0.3). Post-CPAP blood gas was pH 7.40;  $pCO_2$  34 mmHg;  $pO_2$  115 mmHg; BE 1.8;  $HCO_3^-$  21.6 mEq/L; and  $SpO_2$  98%, to correct the hypoxemia caused by the reduced pulmonary compliance. She did not have clinical or instrumental cardiac alterations.

A chest radiograph showed no pleural shedding or parenchymal thickening; however, it did show hypoplastic lungs, congested hila, and marked dorsal right scoliosis.

Lumbosacral magnetic resonance imaging (MRI) in the left supine lateral decubitus position showed right convex lumbar scoliosis, with rotation of the high lumbar metamers; the dorsal rachis appeared completely horizontal. Interapophyseal articulations were bilaterally hypertrophic at the L3 and L4 levels, while a rough osteophytosis was extended from the left side to the L3 posterior arch, causing slight spinal cord stenosis at the same level. No disc protrusions or hernias were noted (Fig. 1). The patient showed prognostic signs of a difficult orotracheal intubation, defined by a Mallampati score of 4, an interincisor gap < 3 cm, chin-thyroid gap < 6 cm, chin-hyoid gap < 4 cm, and no head or neck motility.



**Fig. 1** Magnetic resonance imaging study of the lumbar spine. The better intervertebral space for the needle insertion was L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> (Arrow). Note the reduction of intervertebral space L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub> and the rotation of the vertebral body (L<sub>2</sub> and L<sub>3</sub>) appearing as attenuation of the signal on the sagittal plain.

A 16-gauge peripheral intravenous (IV) catheter was placed, and colloid (hydroxyethyl starch 500 mL/30 min) and crystalloid (Ringer's lactate 1,000 mL, 250 mL/hr) infusions were started. The patient received spinal anesthesia in the right lateral decubitus position with 8 mg of hyperbaric bupivacaine 0.5%, 10 µg of fentanyl, and 0.15 mg of morphine. A sensory level to T4 was reached on the right and T11 metamers on the left. To achieve a homogeneous distribution of local anesthetic, the patient's position was modified in a 20-degree Trendelenburg with left lateral decubitus position for 15 minutes. This position allowed rostral left spread of the sensory level to T8 metamers.

An electrocardiogram and pulse oximeter were attached; the patient's blood pressure was monitored noninvasively. After delivery, a continuous infusion of remifentanyl at 0.08 µg/kg/min for 10 minutes was given to reduce pain with a positive result. The neonatal birthweight was 2,180 grams with Apgar scores of 8 and 9 at one and 5 minutes, respectively.

During the postoperative period, our patient did not experience any pain, nausea, vomiting, pruritus, or urinary retention. She received only two doses of paracetamol (one gram per dose) to achieve a better quality of analgesia. She was discharged from the hospital after one week without complications.

### 3. Discussion

Dyspnea and worsened pulmonary function are common in a patient with SMA. Pregnancy is responsible for an

additional stress on the respiratory system due to alterations in the thoracoabdominal architecture. Severe scoliosis and the weakness of spinal muscular atrophy in SMA patients cause secondary respiratory impairment.

Spinal muscular atrophy is a disease with a gradual severity related to the onset of the symptoms: onset at an early age is associated with more severe clinical features. Although SMAs are classified into 5 types, there are no strong cutoff points and the manifestation of the disease is regarded as a range. Thus it can be expected that the appearance of physical complaints is also gradual. Spinal muscular atrophy type II presents between 6 and 18 months of life, with muscle weakness of the legs and trunk and failure to meet motor milestones (crawling and walking). The prognosis depends on the extent and timing of respiratory complications. Inspiratory muscle weakness predisposes the individual to ventilatory failure, and expiratory muscle impairment causes an ineffective cough, which may lead to secretion retention and chronic atelectasis [13]. The disease has a high prevalence of kyphoscoliosis, difficulty in coughing, joint contractures, and voice/speech problems [14].

In the past, it was unusual for women of child-bearing age with a chronic progressive disease such as SMA to become pregnant, and the pregnancy itself was considered contraindicated and dangerous. More recently, there has been improvement in the survival pattern and functional status of patients with SMA; the survival rate is 80% at 40 years [15]. A previous study reported a survival rate of 98.5% at 5 years and 68.5% at 25 years among 240 type II patients (who could sit up but who never walked) [16]. Life expectancy for patients with SMA Type II is variable. Neither the degree of disability nor the respiratory deficits are reliable predictors of life expectancy. With adaptive treatment, particularly for respiratory insufficiency, the majority of patients survive up to adulthood, although they will never be able to walk independently. With advances in medical care, the life expectancy and ambulatory status of patients with SMA have improved. Although we cannot attribute this trend to any single factor, the management of SMA involves supportive and preventive strategies. It is likely that advances in pulmonary care, such as effective antibiotics for recurrent pneumonia and ventilatory support for respiratory failure, have allowed greater chances for survival. Aggressive nutritional support also has played a significant role. The overall functional and rehabilitative aspects of SMA children also have been improved over the past decades [17].

The result is that most women with SMA are now reaching reproductive age in a relatively healthy state and are weighing the option of having a child. Those who become pregnant require significant assistance from a multidisciplinary team, and must manage pregnancy who SMA-related complications.

With increasing age, recovery after general anesthesia of a SMA patient may be delayed because of restrictive lung disease from malformation and respiratory muscle weakness. The most important aspect to keep in mind when providing

general anesthesia for a patient with SMA is the use of muscle relaxants. While succinylcholine is contraindicated, special attention should be paid to the dosing of muscle relaxant. Some authors report total IV anesthesia without muscle relaxants for patients with SMA [18].

Regional anesthesia is an alternative to general anesthesia. However, regional anesthesia for patients with SMA may cause neurologic deficits. Historically, the use of spinal anesthesia in patients with preexisting central nervous system (CNS) disorders has been contraindicated. The fear of worsening neurological outcome secondary to mechanical trauma, local anesthetic toxicity, or neural ischemia is commonly reported. A retrospective study examining the frequency of progressive neurological complications in patients with preexisting CNS disorders who underwent neuraxial blockade, showed that no new or worsening postoperative neurological deficits occurred when compared with preoperative findings [19]. We think that neuraxial blockade should not be considered an absolute contraindication in patients with preexisting CNS disorders. The decision to perform regional anesthesia in these patients should be based on the risks and potential benefits of each individual case.

Anesthesia in patients with a diagnosis of SMA Type II has been reported in rare cases and is potentially life threatening. The goal is to provide satisfactory anesthesia during surgery and effective postcesarean section analgesia with minimal impairment of the respiratory function. Various problems, particularly weakness of respiratory muscles and abnormal reaction to muscle relaxants, may occur during general anesthesia, often requiring admission to an intensive care unit. Neuraxial anesthesia bypasses the difficulties related to the respiratory system, providing safe and satisfactory analgesia. A complex preoperative MRI study of spinal anatomy to recognize vertebral rotation, vertebral nerve root, and their new course was helpful to assist with the technique. In our patient, the vertebral column rotation and the patient's position on the operating table affected the needle's direction during the puncture. The vertebral rotation, observed with MRI, appears at L3 and reaches a peak (90°) at T8. It also causes the emerging nervous roots to rotate, explaining why local anesthetic reaches T4 metamer on the right and T8 level on the left. There are two reports about the use of subarachnoid anesthesia for cesarean section in two sisters with SMA, although the SMA type was unspecified [7].

This patient received spinal anesthesia, and the difficulties connected with respiratory weaning were avoided with the subarachnoid block. The extension of the block did not cause respiratory failure, but did require remifentanyl infusion after delivery. Postoperative pain control was achieved with subarachnoid morphine and the patient was satisfied. She was safely managed with subarachnoid anesthesia without any deterioration of her underlying neurological condition.

Experience with the anesthetic management of pregnant SMA patients is limited. A MEDLINE search from 1966 to

April 2010 using the keywords "spinal muscular atrophy" and "anesthesia" did not identify any cases of spinal anesthesia for cesarean section. There are few reports in the anesthetic literature about regional anesthesia for cesarean section in patients with SMA [5,8–10,20,21] and all of these patients were SMA Type III.

In conclusion, the management of pregnant women affected by SMA Type II should include the study of pulmonary function. Assessment of the pelvis should be made to decide the mode of delivery, and a MRI study of the spinal column may be considered in order to perform safe and satisfactory subarachnoid anesthesia.

## References

- [1] Bérout C, Karlova M, Bonnefont JP, et al. Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by genetic analysis of circulating fetal cells. *Lancet* 2003;36(9362):1013-4.
- [2] Daniels G, Pettigrew R, Thornhill A, et al. Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy. *Mol Hum Reprod* 2001;7:995-1000.
- [3] Zerres K, Davies KE. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 1999;9:272-8.
- [4] Carter GT, Bonekat HW, Milio L. Successful pregnancies in the presence of spinal muscular atrophy: two case reports. *Arch Phys Med Rehabil* 1994;75:229-31.
- [5] Weston LA, Di Fazio CA. Labor analgesia and anesthesia in a patient with spinal muscular atrophy and vocal cord paralysis. A rare and unusual case report. *Reg Anesth* 1996;21:350-4.
- [6] Pugh CP, Healey SK, Crane JM, Young D. Successful pregnancy and spinal muscular atrophy. *Obstet Gynecol* 2000;95(6 Pt 2):1034.
- [7] Harris SJ, Moaz K. Cesarean section conducted under subarachnoid block in two sisters with spinal muscular atrophy. *Int J Obstet Anesth* 2002;11:125-7.
- [8] Rudnik-Schöneborn S, Breuer C, Zerres K. Stable motor and lung function throughout pregnancy in a patient with infantile spinal muscular atrophy type II. *Neuromuscul Disord* 2002;12:137-40.
- [9] Buettner AU. Anaesthesia for caesarean section in a patient with spinal muscular atrophy. *Anaesth Intensive Care* 2003;31:92-4.
- [10] Prieto Rodrigo MA, Sánchez Montero FJ, Hernández Valero A, Blanco Blanco JF, Muriel Villoria C. Subarachnoid anesthesia in a patient with Kugelberg-Welander-type spinal muscular atrophy. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 2003;50:309-10.
- [11] Yim R, Kirschner K, Murphy E, Parson J, Winslow C. Successful pregnancy in a patient with spinal muscular atrophy and severe kyphoscoliosis. *Am J Phys Med Rehabil* 2003;82:222-5.
- [12] Cuscó I, Barceló MJ, Soler C, Parra J, Baiget M, Tizzano E. Prenatal diagnosis for risk of spinal muscular atrophy. *BJOG* 2002;109:1244-9.
- [13] Wallgren-Pettersson C, Bushby K, Mellies U, Simonds A; ENMC. 117th ENMC workshop: ventilatory support in congenital neuromuscular disorders—congenital myopathies, congenital muscular dystrophies, congenital myotonic dystrophy and SMA (II) 4–6 April 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2004;14:56-69.
- [14] de Groot JJ, de Witte LP. Physical complaints in ageing persons with spinal muscular dystrophy. *J Rehabil Med* 2005;37:258-62.
- [15] Chung BH, Wong VC, Ip P. Spinal muscular atrophy: survival pattern and functional status. *Pediatrics* 2004;114:e548-53.
- [16] Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal



- muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci* 1997;146:67-72.
- [17] Manna MM, Kalra M, Wong B, Cohen AP, Amin RS. Survival probabilities of patients with childhood spinal muscle atrophy. *J Clin Neuromuscul Dis* 2009;10:85-9.
- [18] Choi YH, Gwak M, Lee YK, Lee YM, Lee DH. Intravenous anesthesia in spinal muscular atrophy: a case report. *Korean J Anesthesiol* 2007; 53:803-5.
- [19] Hebl JR, Horlocker TT, Schroeder DR. Neuraxial anesthesia and analgesia in patients with preexisting central nervous system disorders. *Anesth Analg* 2006;103:223-8.
- [20] Habib AS, Helsley SE, Millar S, Deballi P 3rd, Muir HA. Anesthesia for cesarean section in a patient with spinal muscular atrophy. *J Clin Anesth* 2004;16:217-9.
- [21] McLoughlin L, Bhagvat P. Anaesthesia for caesarean section in spinal muscular atrophy type III. *Int J Obstet Anesth* 2004;13:192-5.



# twin research and human genetics

The official journal of the International Society for Twin Studies and the Human Genetics Society of Australasia

Covering all areas of  
human genetics  
with an emphasis on  
twin studies, genetic  
epidemiology, psychiatric  
and behavioral genetics,  
and research on  
multiple births in the  
fields of epidemiology,  
genetics, endocrinology,  
fetal pathology, obstetrics  
and pediatrics.

Volume **15** Number **2**

April 2012

Editor

Nicholas G. Martin

**Abstracts for the 14th  
International Congress on  
Twin Studies and  
The 2nd World Congress  
on Twin Pregnancy  
Florence, Italy, April 1–4, 2012**

IMPACT FACTOR 1.583

Available online from [www.australianacademicpress.com.au](http://www.australianacademicpress.com.au)

This journal is indexed in the following databases: MEDLINE/PubMed EMBASE/Excerpta Medica PsycINFO  
Science Citation Index, Science Citation Index Expanded®  
Current Contents/Clinical Medicine®, Current Contents/Life Sciences®



#### A QUADRUPLLET PREGNANCY COMPLICATED BY GESTATIONAL DIABETES MELLITUS: OBSTETRICAL MANAGEMENT AND NEONATAL OUTCOMES.

A. Sirico, G. M. Maruotti, L. Sarno, S. Simioli, V. Donadono, M. Volo, G. Esposito, M. Di Cresce, P. Martinelli  
University Federico II, Naples, Italy

Infertility treatments have produced an increase in multiple gestations and the virtually related preterm deliveries. Preterm delivery (PTD) places the babies at risk for short- and long-term morbidity and mortality. We present the case of a quadruplet pregnant who was referred in October 2011 to the High-Risk Pregnancy Unit, University Federico II of Naples, at 27 gestation weeks. The pregnancy was obtained after an ovarian stimulation resulting in a tetra-amniotic, tetra-chorionic gestation of two male and two female fetuses. During antenatal ultrasonography screenings, despite an expected reduced biometry compared to singleton pregnancies, the four fetuses presented middle-high biometry parameters. A 75 g OGTT at 28 weeks revealed a condition of gestational diabetes (glycemic values: 97 mg/dl at 0', 201 mg/dl at 60'; 158 mg/dl at 120'). The women was put on hypoglycemic diet and a series of ultrasound and cardiotocographic examinations were performed to assess fetal wellbeing. Umbilical Artery Pulse Index (UA PI) of fetuses showed values within normal ranges. UA PI of each fetus at 30 weeks gestation were: 1,20 (A) ; 1,09 (B) ; 0,86 (C) ; 1,09 (D) and Computerized Cardiotocography (cCTG) analysis showed normal parameters. The patient underwent a caesarean section at 32 weeks gestation (the mean gestational age at delivery for quadruplet pregnancies is 29.5 weeks) and the four babies were delivered without complications; the two female newborns weighted 1630 g (A) and 1430 g (C) while the two male newborns weighted 1470 g (B) and 1740 g (D). Cord-blood samples were collected from each umbilical cord but not showed values of C-peptide > 90° percentile, which is usually considered an adverse outcome for babies of a diabetic mother. At 3 months follow-up, fetus D showed mild hypoglycemia and a biometry more than 70° percentile but no adverse outcomes, while fetus B developed necrotizing enterocolitis (incidence in quadruplet pregnancy 1,7%), underwent three operations and actually he has a short bowel syndrome. Gestational diabetes mellitus (GDM) in a quadruplet pregnancy is a very rare condition and offer an unique chance to investigate the mechanisms that underlie the physiopathology of gestational diabetes in the fetus. It is interesting to reflect on how four fetuses that shared the same maternal diabetic environment developed different outcomes. How much the individual genetic predisposition of this heterozygotic brothers influences their different neonatal outcome. This points out an intriguing topic which needs future research.

#### RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME IN TWINS IN NICU

B. Skenderi Mustafa, M. Shala, H. Ismaili, S. Hoxha, S. Halili  
QRUK Neonatology Clinics

Respiratory Distress Syndrome (RDS) is a syndrome of respiratory malfunction occurring in pre-term newborns. It was analyzed the percentage of preterm with RDS from multiply newborns hospitalized in NICU with diagnosis RDS and we have noticed that 20 % of newborns were from double pregnancies, category this endangered by RDS. Average age of mother was 21 years, average weight on birth was 1420 gram, average of gestative weeks 32; in sex aspect the masculine gender was dominate one: from 14 they are 10, from them 6 were of first births, until on basis of mood of birth: 8 were born in normal way and 6 by C.S. RDS is a problem and a special theme in NICU with same characteristics, which occur as in simple births, as well as with the high incidence of morbidity

#### TWINNING RATES IN THE NORDIC COUNTRIES

A. Skytthe  
The Danish Twin Registry, University of Southern Denmark, Odense C, Denmark

In the 1970's and beginning of 1980's the multiple birth rate was exceptionally low in developed countries, with a twinning rate about 1% of all births. But within the last two decades the multiple birth rate has increased to an unprecedented high level of more than 2% in some countries. The increase has been explained by the introduction and increased use of artificial reproduction technologies (ART). The methods of ART have been refined, for example leading to the implantation of fewer embryos, and in recent years the standard procedure has been to implant only one fertilized egg. Although this change has lead to a decline in the twinning rate in some countries (e.g. Norway) the twinning rate still remains at a high level in others (e.g. Denmark). Based on register data and a survey among Danish twins born since 1983 the development in Nordic twinning rates (natural and ART-related) is discussed.

#### TWINNING ACROSS THE DEVELOPING WORLD

J. Smits<sup>1</sup>, C. Monden<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Radboud University, The Netherlands  
<sup>2</sup>University of Oxford, United Kingdom

**Background:** Until now, little was known about the variation in incidence of twin births across developing countries, because national representative data was lacking. This study provides the first comprehensive overview of national twinning rates across the developing world on the basis of reliable survey data. **Methods:** Data on incidence of twinning was extracted from birth histories of women aged 15-49 interviewed in 150 Demographic and Health Surveys, held between 1987 and 2010 in 75 low and middle income countries. During the interview, information on all live births experienced by the women was recorded, including whether it was a singleton or multiple birth. Information was available for 2.47



CONGRESS ABSTRACTS ON CD-ROM



XX FIGO WORLD CONGRESS OF  
GYNECOLOGY AND OBSTETRICS

Organised by



**FIGO**

INTERNATIONAL FEDERATION OF  
GYNECOLOGY & OBSTETRICS

7<sup>TH</sup> - 12<sup>TH</sup> OCTOBER 2012  
FIERA DI ROMA  
ROME, ITALY

[www.figo2012.org](http://www.figo2012.org)

**W184****EPILEPSY AND PREGNANCY – AN OBSTETRIC PERSPECTIVE**

K. Arunachalam<sup>1</sup>, A. Janarthanan<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Obstetrics and Gynaecology, Madha Medical College and Hospital, Chennai, Tamil Nadu, India, Chennai, Tamil Nadu, India; <sup>2</sup>Stanley Medical College and Hospital, Chennai, Tamil Nadu, India

**Objectives:** Each year 20,000 women with epilepsy become pregnant. This number has grown as marriage rates have increased for women with epilepsy as parenting has become socially supported. Pregnancy poses special problems with epilepsy. Issues related to pregnancy, epilepsy, AntiEpileptic Drugs-usage – management as a whole have been fraught with confusion and misconceptions. Objective of this study was to clean up some of these misconceptions and to assess the effects of epilepsy on pregnancy.

**Materials:** From Jan 2009 – Dec 2009, 70 antenatal women with H/O Epilepsy were recruited for the study. A detailed history, time of onset, type of seizure, last episode, Neurologist review, the type of drugs (mono/polytherapy) seizures in present pregnancy (trimester-wise) were asked.

**Methods:** AN care was given in our OPD. II trimester anomaly scan was done. Combined management with neurologist was carried out throughout pregnancy. VitK 5 mg OD was given from 36 weeks. Labour monitored and newborns reviewed by neonatologists. Inj.VitK was administered immediately after birth of the baby. Inclusion criteria: Antenatal women with pre existing epilepsy. Exclusion criteria: New onset seizures due to Eclampsia, Infections, Metabolic derangements and Patients with structural lesions.

**Results:** 77.1% women belonged to 20–25 years of age with equal number of Primi and Multigravidae. New onset seizures only 2.9% and pre-existing epilepsy (97.1%). 54.3% received monotherapy. Among anti-epileptic drugs T.Carbamazepine was the most frequently used drug (50%) in our study.

Among 68 patients 5 pts had polytherapy (carbamazepine + phenytoin). 30% had seizures in III trimester and 60% who received polytherapy developed seizures.

Intrapartum period was uneventful. 54.3% had vaginal deliveries and 47.1% were LBW babies.

Congenital anomalies (NTD) in our study were only 2.9% (meningomyelocele) and occurred in patients taking Phenytoin sodium.

**Conclusions:** To optimize pregnancy outcome Seizures should be well controlled preconceptionally and appropriate Anti Epileptic Drug as monotherapy in the lowest effective dosage throughout pregnancy.

**W185****MANAGEMENT OF PREGNANCY AND A POSTNATAL PERIOD IN WOMEN WITH VENOUS THROMBOSES**

A.S. Eshaliyeva<sup>1</sup>, E.M. Nosinov<sup>2</sup>. <sup>1</sup>National Centre of Maternity and Childhood Welfare, Bishkek, Kyrgyzstan; <sup>2</sup>Kyrgyz-Russian Slavonic University, Bishkek, Kyrgyzstan

**Objectives:** Management of pregnancy and postpartum period in women with venous thromboses with the purpose of pregnancy prolongation, successful labor and prevention of PATE.

**Materials:** 23 pregnant and 36 puerperants with venous thromboses. The average age of the pregnant women was 28.3±4.3 years, puerperants was 29.6±4.0. Gestation age of the pregnant women with thrombosis: at 12 weeks-in 4 cases (17.4%), 12–24 weeks-in 4 (17.4%), 25–40 weeks – in 15 (65.2%). 8 pregnant women (34.8%) had complicated pregnancy – a threatened abortion, anaemia, acute inflammation process. All puerperants had complications: preeclampsia, anaemia, abruptio placenta, IUFD, premature birth, PPH, operative delivery, uterus amputation.

**Methods:** General clinical and obstetrical examination, angiographic research, ultrasonic research of veins, including spectral

dopplerography and duplex scanning with colour indication of a bloodstream, blood coagulation system.

**Results:** Localization of thromboses at pregnant woman: ilio-cavalic phlebothrombosis (ICP) – 3 (13.0%), ilio-femoral (IFP) – 12 (52.2%), a deep shin veins thrombosis – 4 (17.4%), subcutaneous thromboses – 4 (17.4%). 3 pregnant women had embologenic form, 5 women – occlusive form.

The puerperants: the ICP – 9 (25.0%), the IFP – 23 (63.9%), the deep shin veins thrombosis – 4 (11.1%), subcutaneous thrombosis – 1 (2.8%), embolic form in 12 cases (33.3%), 19 puerperants – occlusive form.

In the group of the puerperants the PTE was diagnosed in 7 cases (19.4%). The surgical prevention of the PTE was conducted for 6 pregnant: for two Caesarian operation and a plication of the inferior vena cava, 3 pregnant women with full-term pregnancy had a Caesarian operation and a plication of iliac vein, one pregnant had the Troyanov operation. The 11 of 12 puerperants with an embologic form had got: implantation of the cava-filter, plication of inferior vena cava, Troyanov operation. 16 pregnant women (69.6%) had successfully given birth, 2 pregnant (8.7%) had a small Caesarian operation, 5 pregnancies (21.7%) were interrupted within 8–12 of weeks after the angiographic research.

**Conclusions:** The management of pregnancy in women with venous thromboses with an application of a complex of diagnostic and therapy-preventive measures (including surgical methods) allows to prolongate pregnancy, to manage delivery successfully and to avoid the pulmonary thromboembolism.

**W186****OBSTETRICAL MANAGEMENT IN PATIENTS WITH PORTAL CAVERNOMA**

M. Di Cresce<sup>1</sup>, G.M. Maruotti<sup>1</sup>, L.L. Mazzarelli<sup>2</sup>, G. Mallia Milanese<sup>1</sup>, S. Simioli<sup>1</sup>, A. Sirico<sup>1</sup>, R. Saviano<sup>1</sup>, G. Esposito<sup>1</sup>, V. Donadono<sup>1</sup>, P. Martinelli<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Division of High Risk Pregnancy-Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples Federico II, Napoli, Napoli, Italy; <sup>2</sup>Diagnostica Ecografica e Prenatale Aniello Di Meglio, Naples, Napoli, Italy

**Objectives:** To evaluate and to determine the obstetrical management in patients with Portal Cavernoma.

**Materials:** A.C., a 25-years old patient, was diagnosed with a portal cavernoma by the age of 7 through ultrasonography evaluation.

**Methods:** During the following years, the patient was affected by several disorders, such as bleeding from oesophageal varices, cholelithiasis and splenomegaly all attributable to the lying condition. In 2009, the patient referred to our Division of High Risk Pregnancy (Department of Obstetrics and Gynecology) and underwent to an ultrasound evaluation, which pointed out the presence of several hyperechoic formations in the uterine cavity.

**Results:** At the day, the patient is still looking for a pregnancy; in the preconception counselling all risks and complications which a patient may experience during pregnancy and post partum were outlined.

**Conclusions:** Pregnancies in women with a portal cavernoma must be considered high-risk pregnancies, due to the high risk of complications; in literature are reported the increased incidence of other cavernomas in other tissues (eye, CNS, bone marrow), the increased risk of bleeding due to Thrombocytopenia, the Haemorrhage from oesophageal varices; for this reason, those patients need to be followed by III-level Centers and by a multi-disciplinary team with collaboration of an obstetrician, an hepatologist, a radiologist and an anesthesiologist, in order to better underline all the issues involving the obstetrician, internist, instrumental and anesthetic relevancy. The incidence of abortion, preterm deliveries and still births is 20%, 15.4% and 7.7% (3). Anyway, pregnancy outcome is expected to be successful in women with EHPVO if disease is adequately controlled prior to pregnancy.



#### Demographic Details

Surname Pierluigi  
 First Name Giampaolino  
 Title DR  
 (Prof, Dr, Mr, Mrs, Ms)  
 Hospital/Institution University "Federico II" Naples  
 Department Obstetrics and Gynecology,  
 Address (Including post/zip code) Pansini Street 5 Naples 80131  
 Country Italy  
 Telephone (e.g. +44-20-87433106) +393392976486  
 Email giamp.pigli@virgilio.it  
 Please re-type your email address giamp.pigli@virgilio.it

#### Abstract Category

Prevention and Early Detection

#### Abstract Title (max 160 characters):

Virilizing ovarian Krukenberg tumor in a pregnant woman

#### Abstract Text (max 2000 characters/300 words):

Krukenberg tumor is an ovarian metastasis of a gastric tumor and accounts for 1%-2% of all ovarian tumors. This neoplasm are mostly found as metastatic signet-ring cell adenocarcinomas in young, premenopausal women and are bilateral in over 80% of cases. A 32-year-old woman presented at approximately the 30<sup>th</sup> week of pregnancy with signs of virilization. The patient had no other endocrine symptoms. The pregnancy was uneventful until she reported facial acne and onset of prominent facial hair. Abdominal ultrasound revealed bilateral large compact ovarian tumors. Testosterone, progesterone and 17-H-progesterone levels were elevated. An exploratory laparotomy and cesarean section was taken. Both adnexa showed large compact tumors measuring 12 cm and 11.5 cm with a lobulated external surface and bilateral tumorectomy was performed. Pathological examination showed typical Krukenberg neoplasm. Total gastrectomy was performed and a gastric adenocarcinoma of diffuse type infiltrating the gastric wall with lymphnode metastasis was diagnosed. The patient received adjuvant chemotherapy and radiotherapy. The acne on the face cleared up and the hair growth returned to normal. The androgen serum levels were normal after the operation. The symptoms usually are non specific and related at the presence of pelvic mass. The endocrine manifestation, such as virilization during pregnancy, may result from stromal luteinization. The pregnant women with a Krukenberg tumor show a particular tendency to become virilized. This is thought to be due to stimulation of the luteinized cells by hCG. The signs of masculinization usually regress after removal of the ovarian tumor or termination of pregnancy. Due to the rare nature of these tumors, there is no current standardization for the diagnosis and the treatment. Resection of the primary lesion may have a role in the management of this neoplasm of stomach origin, but no effective therapy has been reported so far.

#### Presentation Method

Oral or Poster

#### Abstract Authors

P Giampaolino, Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples, , Italy (Presenting); G Bifulco, Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples, , Italy; S Simioli, Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples, , Italy; I Morra, Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples, , Italy; F Tarsitano, Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples, , Italy; C Nappi, Department of Obstetrics and Gynecology, University "Federico II", Naples, , Italy





# LA DONNA

IL FASCINO DELLA GINECOLOGIA  
MODERNA TRA SALUTE E  
SICUREZZA DELLA DONNA:  
AGGIORNAMENTI E NECESSITÀ

MONTECATINI TERME  
12 - 13 - 14 APRILE 2012

PALAZZO DEI CONGRESSI  
DI MONTECATINI TERME



3° CONGRESSO NAZIONALE FIGO



2° CONGRESSO NAZIONALE AGIF



CONGRESSO STRAORDINARIO AGUI



17° CONGRESSO NAZIONALE AGICO



14° CONGRESSO NAZIONALE AGEO

ATTI

**CO14.7**

**- L'ENTROPIA APPROSSIMATA COME NUOVO PARAMETRO PER IL TIMING DEL PARTO NELLE GRAVIDANZE COMPLICATE DA DIABETE -**

SIRICO ANGELO<sup>4[1]</sup>, SIMIOLI STEFANIA<sup>[1]</sup>, MALLIA MILANES GIOVANNA<sup>[1]</sup>, TESSITORE GIOVANNI<sup>[1]</sup>, ESPOSITO GIUSEPPINA<sup>[1]</sup>, DONADONO VERA<sup>[1]</sup>, SAVIANO ROSA<sup>[1]</sup>, DI CRESCE MARCO<sup>[1]</sup>, SARNO LAURA<sup>[1]</sup>, MIGLIUCCI ANNALISA<sup>[1]</sup>, MAZZARELLI LAURA LETIZIA<sup>[1]</sup>, MARUOTTI GIUSEPPE MARIA<sup>[1]</sup>, MARTINELLI PASQUALE<sup>[1]</sup>

<sup>1</sup>AOU FEDERICO II - AREA FUNZIONALE DI EMERGENZE OSTETRICHE E GINECOLOGICHE, ~ NAPOLI

*Attualmente la dinamica cardiovascolare fetale nelle ultime settimane di gestazione viene valutata attraverso la cardiotocografia computerizzata (cCTG); la variabilità a breve termine della frequenza cardiaca (STV) è considerata il parametro più attendibile del benessere fetale.*

*Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'efficacia di un parametro cardiotocografico non classico quale l'entropia approssimata della frequenza cardiaca (ApEn), nel timing del parto nelle gravidanze complicate da diabete, confrontandola con la STV.*

*Dal 2006 al 2011 sono state reclutate 47 donne con gravidanza complicata da diabete, 33 (70%) con diabete mellito di tipo 1, 12 (25,5%) con diabete gestazionale (GDM), 2 (4,5%) con diabete mellito tipo 2. Per ogni caso sono stati registrati l'epoca del parto ed i valori di STV ed ApEn dell'ultimo tracciato cCTG prima del parto. Considerato che risultano essere outcome avversi sia un parto pretermine (< 37 settimane) che un parto post-termine (> 41 settimane), è stata effettuata una regressione non lineare (quadratica) correlando STV e ApEn con l'epoca del parto. Sono stati valutati due gruppi di pazienti; gruppo 1: i casi con parto a termine; gruppo 2: i casi con parto pretermine (< 37 settimane). L'analisi statistica è stata effettuata mediante un test t-Student per confrontare le medie di ciascun parametro nei due gruppi. Sono stati analizzati e confrontati i valori di sensibilità (Se), specificità (Sp), valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) di ApEn e STV per la predizione di un parto pretermine.*

*Esiste una relazione quadratica statisticamente significativa tra ApEn ed epoca del parto ( $r^2=0,367$ ;  $p>0,05$ ); non esiste una relazione quadratica tra STV ed epoca del parto ( $r^2=0,067$ ;  $p<0,05$ ). Il valore medio di ApEn ( $1,40 \pm 0,13$  vs  $1,24 \pm 0,20$ ;  $p=0,01$ ) e STV ( $5,17 \pm 1,26$  vs  $4,73 \pm 1,97$ ;  $p=0,45$ ) è minore nel gruppo 2 rispetto al gruppo 1. La validità di ApEn (Se 57%; Sp 91%; VPP 73%; VPN 83%) risulta sovrapponibile alla STV (Se 71%; Sp 51%; VPP 38%; VPN 81%) nel predire il rischio di parto pretermine.*

*La ApEn risulta utile nella determinazione del benessere fetale nelle gravidanze complicate da diabete e può rivelarsi utile nel migliorare la capacità della STV di predire accuratamente il timing del parto.*